

**INHIBITION VON PAPAIN-ÄHNLICHEN
CYSTEINPROTEASEN DURCH PROPEPTIDKONSTRUKTE
DES KATHEPSIN F**

Dissertation
zur Erlangung des medizinischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diana Müller
geboren am 07.02.1984 in Mühlhausen

Gutachter

1.
2.
3.

Tag der öffentlichen Verteidigung:

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A ₂₈₀	Absorption bei 280 nm
Abb.	Abbildung
A-Überhang	Adenylat-Überhang
AMC	7-Amino-4-Methyl-Cumarin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
AU	Absorptionseinheit
Aqua dest.	Aqua destillata
bp	Basenpaare
cDNA	copy-2-Desoxyribonukleinsäure
DA	Dalton
dA	2-Desoxyadenin
dATP	2-Desoxyadeninnukleotidtriphosphat
dCTP	2-Desoxycytosinnukleotidtriphosphat
dGTP	2-Desoxyguaninnukleotidtriphosphat
dNTP	2-Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	2-Desoxythymidinnukleotidtriphosphat
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	2-Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2-Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	2-Desoxythymidinb nukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E64	(N-(trans-Epoxysuccinyl)-L-leucin-4-guanidinobutylamid, trans-Epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butan
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiammoniumtetraazetat
FE	Fluoreszenzeinheiten
GdnHCl	Guanidinium-Hydrochlorid
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-disulfid
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure

h	Stunde(n)
H	N-Terminus ohne Schutzgruppe
IPTG	Isopropyl- β -thiogalaktosid
K-Azetat	Kalium-Azetat
kb(p)	Kilobasen(paare)
kDA	kilo-Dalton
K_i	Dissoziationskonstante eines Enzym-Inhibitor-Komplexes
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
k_{cat}	Wechselzahl
LB-Agar	lysogeny-broth-Agar
LB-Medium	lysogeny-broth-Medium
MALDI	matrix-assoziierte Laserdesorption und –ionisation
MCS	multiple cloning site
MG	Molekulargewicht
MTP(s)	Mikrotiterplatte(n)
NMR	nukleare Magnetresonanz
OD_{600nm}	optische Dichte, gemessen mit Licht der Wellenlänge 600 nm
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
RO	Refolding Optimizer
rpm	rotations per minute
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat-pulsed-Gel-Elektrophorese
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
Tris	N,N,N-Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Units
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
Z	N-terminale Benzoyl-Schutzgruppe

2. INHALTSVERZEICHNIS

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	V
2 INHALTSVERZEICHNIS.....	VII
3 ZUSAMMENFASSUNG.....	1
4 EINLEITUNG.....	3
4.1 Die Familie der Cysteinproteasen.....	3
4.2 Kathepsin F, ein Vertreter der Cysteinproteasen.....	7
5 ZIELE DER ARBEIT.....	10
6 MATERIALIEN UND METHODEN.....	11
6.1 Material.....	11
6.1.1 Enzyme, Substrate und Antibiotika.....	11
6.1.2 Medien und Puffer für molekularbiologische Techniken.....	12
6.1.3 Reagenziensätze zur Bearbeitung von DNA.....	13
6.1.4 Bakterienstämme und Vektoren.....	13
6.1.4.1 Klonierungsstamm <i>E.coli</i> TOP10 (Invitrogen).....	13
6.1.4.2 Expressionsstamm <i>E.coli</i> BL21 (DE3) pLys S (Invitrogen).....	13
6.1.4.3 Expressionsstamm <i>E.coli</i> BL21 (DE3) pLys S Rosetta (Novagen).....	14
6.1.4.4 Klonierungsvektor pCR 2.1-TOPO (Invitrogen).....	14
6.1.4.5 Expressionsvektor pRSET-B (Invitrogen).....	15
6.1.5 Geräte.....	15
6.1.5.1 Grundausrüstung.....	15
6.1.5.2 Gentechnische Arbeitsmittel.....	16
6.1.5.3 Enzymologische Arbeitsmittel.....	16

6.2 Methoden.....	16
6.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	16
6.2.1.1 Amplifikation von DNA.....	16
6.2.1.2 Anfügen von dA-Überhängen.....	18
6.2.1.3 Herstellen der Plasmid-Vektoren und Transformation kompetenter Bakterienzellen.....	18
6.2.1.4 Restriktionsbverdau und Größenbestimmung der Spaltstücke	19
6.2.1.5 DNA-Sequenzierung.....	20
6.2.1.6 Expression im analytischen Maßstab.....	20
6.2.1.7 Expression im präparativen Maßstab.....	21
6.2.2 Computerprogramme und Datenbanken.....	22
6.2.3 Proteinchemische Methoden.....	22
6.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese.....	22
6.2.3.2 Reinigung des Propeptides durch Gelchromatographie.....	25
6.2.3.3 Proteinidentifizierung durch MALDI-TOF.....	25
6.2.3.4 Renaturierung des Prokathepsin F.....	25
6.2.3.5 Prozessierung des renaturierten Prokathepsin F mit Pepsin.....	26
6.2.4 Aktivitätsbestimmungen des Proenzym sowie des reifen Kathepsin F	26
6.2.5 Km-Wert-Bestimmung des Prokathepsin F.....	27
6.2.6 E64-Titration.....	28
6.2.7 Inhibition von Kathepsinen durch das Kathepsin F-Propeptid.....	28
 7 ERGEBNISSE.....	 30
 7.1 Expression und Charakterisierung von Teilsequenzen des humanen Prokathepsin F.....	 30
7.1.1 Expression in <i>E. coli</i>	30
7.1.2 Charakterisierung der exprimierten Konstrukte mittels MALDI- TOF.....	34
7.1.3 Charakterisierung der rekombinaten Proteine durch N-terminale Sequenzierung.....	35
 7.2 Reinigung und Charakterisierung des Propeptides	 35

7.3 Renaturierung, Prozessierung und enzymologische Charakterisierung des Prokathepsin F.....	39
7.3.1 Renaturierung des Prokathepsin F.....	39
7.3.1.1 Renaturierungsdauer.....	41
7.3.1.2 Vorbehandlung mit DTT.....	41
7.3.1.3 Renaturierungstemperatur.....	41
7.3.1.4 Renaturierungsmedium.....	42
7.3.1.5 Verdünnung mit dem Renaturierungsmedium.....	44
7.3.1.6 Inkubation mit dem Substrat Z-Phe-Arg-AMC.....	44
7.3.2 Prozessierung des Prokathepsin F.....	47
7.3.2.1 Prozessierung unter Katalyse mit Pepsin.....	47
7.3.2.2 Autoprozessierung.....	50
7.3.3 Bestimmung des kcat-Wertes für Prokathepsin F.....	51
7.3.4 K_M-Wert-Bestimmung für Prokathepsin F.....	52
 7.4 Inhibitionsstudien des Propeptides vom Kathepsin F mit verwandten Cysteinproteasen.....	 54
 8 DISKUSSION.....	 57
 9 SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	 70
 10 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS.....	 72
 11 ANHANG.....	 86
Danksagung	86
Ehrenwörtliche Erklärung	87
Lebenslauf	88

3. ZUSAMMENFASSUNG

Die Kathepsine F und W sind die beiden Vertreter einer erst vor etwa 10 Jahren entdeckten Unterfamilie der schon lange bekannten und gut untersuchten Familie der Papain-ähnlichen Cysteinproteasen des Menschen. In der Arbeitsgruppe gab es Erfahrungen bei der Herstellung und Charakterisierung solcher lysosomaler Proteasen, so dass die Einbeziehung der neuen Unterfamilie naheliegend war. Das Kathepsin-W-Propeptid war bereits erfolgreich exprimiert und charakterisiert worden; ich sollte Ähnliches beim Kathepsin F versuchen. Diese Cysteinprotease erschien auch deshalb interessant, weil es im Vergleich zu allen übrigen Familienmitgliedern eine außergewöhnlich lange Proregion aufweist, die mit 251 mehr als die doppelte Anzahl der sonst in der Proregion vorhandenen Aminosäuren besitzt. Sequenzvergleiche zeigten, dass die N-terminale Verlängerung zu 27 % homolog zum Hühnerei-Cystatin ist, einem seit langem bekannten hochaffinen Inhibitor von Cysteinproteasen, der auch aktives Kathepsin F hemmt. Die Funktion dieser so genannten Cystatin-ähnlichen Domäne ist völlig unklar, denn Prokathepsin F besitzt auch noch die für die Papainfamilie typische „klassische Proregion“, die im Durchschnitt 100 Aminosäuren lang ist und auf Grund ihrer Primärstruktur und der unmittelbaren kovalenten Verknüpfung mit dem N-Terminus der Enzymdomäne sehr wahrscheinlich auch beim Kathepsin F die Substratbindungsstelle abschirmt. Warum hat sich in der Evolution ein Enzym mit zwei potentiellen Inhibitoren entwickeln können?

Um Antwort auf diese Frage zu bekommen, war geplant, die Proregion mit und ohne die Cystatin-ähnliche Domäne gentechnisch herzustellen und ihre Wechselwirkung mit vollständigem bzw. um die Cystatin-ähnliche Domäne verkürzten Prokathepsin F und mit dem reifen Enzym zu untersuchen. Das reife Enzym sollte nicht als solches exprimiert werden, denn zur Ausbildung der nativen Konformation ist die Anwesenheit der Proregion erforderlich (so genannte intramolekulare Chaperonfunktion), sondern durch auto- oder heterokatalytische Prozessierung aus einer der beiden Proformen hergestellt werden. Die heterologe Expression all dieser Proteine und Peptide wurde in *E. coli* durchgeführt; dazu und zur anschließenden Renaturierung der Expressionsprodukte gab es Erfahrungen in der Arbeitsgruppe. Auch zur Reinigung, Identifikation und Charakterisierung von Polypeptiden und zur Aktivitätsmessung von Proteasen waren die apparative Ausrüstung und das Know-how vorhanden, beispielsweise eine FPLC-Anlage mit verschiedenen Säulen, MALDI-ToF, Elektrophoreseapparaturen, fluorige Substrate und Fluoreszenzreader.

Schon nach der ersten Versuchsreihe zur Expression der beschriebenen Konstrukte wurde klar, dass es Probleme bei der Expression der Cystatin-ähnlichen Domäne gibt. Nur nach Transformation mit den verkürzten Konstrukten kam es zur Akkumulation der Genprodukte in bakteriellen Einschlusskörperchen. Die Suche nach seltenen Codons ergab dann tatsächlich eine Häufung im N-terminalen Abschnitt, aber auch der Wechsel zu dem speziell zur Lösung solcher Codon-Usage Probleme konstruiertem *E.coli*-Rosetta-Stamm brachte keinen Erfolg. Wegen der zentralen Bedeutung für das Anliegen der Arbeit wurden diese Expressionsversuche mehrfach wiederholt. Damit ist es bisher keiner der insgesamt vier Arbeitsgruppen, die Prokathepsin F herstellen wollten, gelungen, die vollständige Sequenz als rekombinantes Protein zu exprimieren, obwohl ganz unterschiedliche Expressionssysteme (Bakterien, Hefen, Insektenzellen) verwendet wurden.

Mit vergleichbarem Aufwand wie die Expression wurde auch die Renaturierung des verkürzten Prokathepsin F versucht, denn nur über diesen Zwischenschritt war reifes Kathepsin F zu gewinnen, das zur funktionellen Charakterisierung des erfolgreich hergestellten Propeptides benötigt wurde. Dabei gab es zumindest ein Teilergebnis: Ganz offensichtlich benötigt das Kathepsin F die Cystatin-ähnliche Domäne als intramolekulares Chaperon. Ihr Fehlen blockiert die Strukturierung der Enzymdomäne größtenteils auf der Stufe eines Molten-globule-Intermediates, das allerdings in Gegenwart von Effektoren (Substrate oder Inhibitoren) langsam in die funktionelle Konformation übergeht. Wie bereits von einer anderen Arbeitsgruppe publiziert, gelang auch uns die anschließende Prozessierung zum reifen Enzym nicht, weder auto- noch heterokatalytisch. Da das Enzym weder gehandelt noch getauscht wird, stand zur Charakterisierung der Propeptide kein Kathepsin F zur Verfügung. Die Versuche zur inhibitorischen Wirksamkeit beschränkten sich deshalb auf die drei verwandten Kathepsine H, S und L. Nur mit Kathepsin L zeigte sich inhibitorische Kreuzreaktivität, die mit einem K_i von ca. 100 nM erheblich ist. Eine proteolytische Zerstörung des Propeptides durch Kathepsin L findet nicht statt.

Im Rahmen der Arbeit ist es also gelungen, den zur Proregion vieler Mitglieder der Papain-Familie homologen Teilbereich aus der Kathepsin-F-Proregion gentechnisch herzustellen und funktionell zu untersuchen. Die Tatsache, dass dieses Propeptid die (nach dem Kathepsin W) am nächsten verwandte Protease wirksam hemmt, macht es sehr wahrscheinlich, dass es diese Funktion auch gegenüber seinem Mutterenzym erfüllt.

4. EINLEITUNG

4.1 Die Familie der Cysteinproteasen

Kathepsin F ist ein Vertreter lysosomaler Proteasen. Proteasen sind für die hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen im intra- und extrazellulären Stoffwechsel verantwortlich. Kathepsin ist ein Kunstwort, abgeleitet von den griechischen Wörtern für „verdauen“ und „kochen“, und sollte ursprünglich für den Proteinkatabolismus in den Lysosomen zuständige Endopeptidasen zusammenfassen. Diese Definition der Kathepsine ist heute überholt, beispielsweise verbleibt Kathepsin W im endoplasmatischen Retikulum und ist gar nicht enzymatisch aktiv (Bühling *et al.* 2000, Wex *et al.* 2001), aber es wird traditionell weiter an ihrem Namen festgehalten. Aufgrund seines Cysteinrestes im aktiven Zentrum gehört Kathepsin F der Superfamilie der Cysteinproteasen an. Diese Gruppe ist heterogen und kann in über 20 Familien, z.B. Papainfamilie, Calpaine, Streptopaine, Clostripaine, Caspasen und virale Cysteinproteasen, eingeteilt werden. Wie die Aufzählung erkennen lässt, werden Cysteinproteasen sowohl in Pro- als auch in Eukaryonten und Viren exprimiert. Es wurden bisher 11 humane Kathepsine identifiziert, darunter sowohl Amino- und Carboxy-Exopeptidasen als auch Endopeptidasen. Die Endopeptidasen überwiegen eindeutig; die Exopeptidasen haben sich sehr wahrscheinlich aus evolutionär älteren Endopeptidasen entwickelt. Neben den schon erwähnten Cysteinproteasen gehören auch Aspartatproteasen (Kathepsin D und E) und Serinproteasen (Kathepsin A und G) zu den Kathepsinen (Bühling *et al.* 2000).

Die speziellen Aufgaben der Kathepsine und die Stoffwechselprozesse, in die sie eingreifen, sind sehr unterschiedlich. Kathepsin L ist, zusammen mit Kathepsin B, entscheidend am unspezifischen Proteinabbau in den Lysosomen beteiligt, aber auch spezifisch in die Antigen-Präsentation im Thymus involviert (Nakagawa *et al.* 1998). Kathepsin K kommt vor allem in den Osteoklasten vor und spaltet tripelhelikales Kollagen, welches den Knochen und anderen Bindegewebsstrukturen die Zugfestigkeit verleiht (Atley *et al.* 2000). Ein Defekt im Kathepsin-K-Gen spielt eine Rolle bei der Entstehung von Skelettdysplasien und bei der Pyknodysostose (Drake *et al.* 1996, Johnson *et al.* 1996). Kathepsin S spielt eine entscheidende Rolle für das menschliche Immunsystem bei der Präsentation von Fremdan antigenen, indem es durch N-terminale Prozessierung der invarianten Kette, der sogenannten li-chain, des MHC-Klasse-II-Rezeptorkomplexes die Einlagerung des prozessierten Antigens in die Rezeptortasche möglich macht (Riese *et al.* 1996, Villadangos *et al.* 1997). Das überwiegende Vorkommen von

Kathepsin W in CD8-positiven Zellen und die erhöhte Expression in hämatogenen Progenitorzellen lässt ebenfalls Aufgaben im Rahmen der Immunität vermuten, obwohl aktives Enzym bisher nicht nachgewiesen werden konnte (Bühling *et al.* 2000). Dem autosomal-rezessiv vererbten Chédiak-Higashi-Syndrom liegt neben dem Mangel an Elastase auch ein Fehlen von Kathepsin G in neutrophilen Granulozyten zu Grunde. Dies führt unter anderem zu einer verminderten Chemotaxis und Bakterizidie der neutrophilen Granulozyten (Takeuchi *et al.* 1989). Einige Kathepsine werden in Tumorzellen überexprimiert und als Proenzyme und/oder aktive Enzyme sezerniert. Ihre Bedeutung als Tumorgenesefaktor ist aber noch nicht geklärt (Mohamed and Sloane 2006).

Die lysosomalen Kathepsine werden als Präproenzyme von Ribosomen am endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und gelangen in dessen Lumen, wo sofort die hydrophobe Signalsequenz abgespalten wird. Bei der anschließenden Faltung entstehen Proenzyme, die bereits ein funktionstüchtiges katalytisches Zentrum haben; dieses ist aber durch die Proregion blockiert. Nach der Glykosylierung von Asparaginsäureresten erfolgt der Weitertransport in den Golgiapparat. Hier erfolgt eine Modifikation der Oligosaccharidseitenketten. Als Schlüssel für den Weitertransport vom Golgi-Apparat zu den Lysosomen wurden bei den Kathepsinen die auch bei anderen lysosomalen Proteinen verbreiteten Mannose-6-Phosphatreste nachgewiesen. Es wurden allerdings auch Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-unabhängige intrazelluläre Anreicherungen der Kathepsine in den Lysosomen, z.B. für das Kathepsin L (McIntyre *et al.* 1993), beschrieben. Der absinkende pH bei der Reifung der Lysosomen führt durch eine pH-abhängige Abspaltung der inhibitorischen Proregion auch zur Reifung, d.h. Aktivierung der Kathepsine (Nishimura and Kato 1987¹, Nishimura and Kato 1987²).

Die Hauptfunktion der Proregionen von Cysteinproteasen ist offensichtlich der Schutz der Zellen vor der proteolytischen Aktivität während des Transports zu den Lysosomen. Diese inhibitorische Funktion ist bei vielen Kathepsinen schon sehr gut untersucht worden. Das wurde dadurch wesentlich erleichtert, dass nicht nur die kovalent mit dem Enzym verbundene Proregion inhibitorisch wirkt, sondern auch das so genannte Propeptid, also ein freies Peptid mit der Aminosäuresequenz der Proregion, das sich gentechnisch leicht herstellen lässt. Die inhibitorische Wirkung der Propeptide wurde beispielsweise für die Kathepsine B, H, K, L und S nachgewiesen (Fox *et al.* 1992, Benedix 2007, Billington *et al.* 2000, Guay *et al.* 2000). In diesem Zusammenhang ist die Tatsache interessant, dass es innerhalb der Papain-Familie recht ähnliche Strukturen der aktiven Enzyme (Coulombe *et al.* 1996, LaLonde *et al.* 1999, Kaulmann *et al.* 2006), aber stark unterschiedliche Strukturen der Propeptide gibt. Das letzte

den Verdacht nahe, dass Proregionen neben der Inhibition der Mutterenzyme noch weitere Funktionen erfüllen, die bei den einzelnen Kathepsinen durchaus unterschiedlich sein könnten. Diese wären beispielsweise die Stabilisierung der Proteinstruktur, die Zielsteuerung in unterschiedliche Zellkompartimente und nicht zuletzt die Unterstützung der korrekten Faltung während der Biosynthese. Letzteres wird als intramolekulare Chaperonfunktion, gelegentlich auch als Foldasefunktion, bezeichnet, wobei Proregionen aber im Gegensatz zu den „echten“ Chaperonen hochspezifisch für ihr Mutterenzym sind (Fox *et al.* 1992, Li *et al.* 1995, Carmo-
na *et al.* 1996, Cygler and Mort 1997). Für die bakteriellen Serinproteasen Subtilisin E und α -lytische Protease gibt es bereits sehr detaillierte Studien zur Faltungskatalyse durch die jeweiligen Proregionen mit interessanten strukturellen und energetischen Einzelheiten (Zhu *et al.* 1989, Sohl *et al.* 1998). Bei den Cysteinproteasen stehen derartige Untersuchungen erst am Anfang, es gibt aber schon eindeutige Beweise für die Foldasewirkung der Proregionen gegenüber den jeweiligen Mutterenzymen, *in vivo* für die Kathepsine K, L und S (Gelb *et al.* 1996, Hou *et al.* 1999, Tao *et al.* 1994, Kreusch *et al.* 2000) und *in vitro* für die Kathepsine L, S und C sowie für die Cysteinprotease von *Bombyx mori* (Körner 2007, Pietschmann *et al.* 2002, Cigić *et al.* 2000, Yamamoto *et al.* 1999).

Strukturell zeichnen sich die reifen, aktiven Proteasen der Papain-Familie durch zwei etwa gleich große globuläre Domänen aus, die als R und L bezeichnet werden. Zwischen ihnen befindet sich die Substratbindungsstelle (Brocklehurst *et al.* 1988). Wie alle Cysteinproteasen besitzen auch die Mitglieder der Papain-Familie in dieser Substratbindungsstelle ein vollständig konserviertes katalytisches Zentrum, bestehend aus den Aminosäuren Cystein 259 (25), Histidin 431 (159) und Asparagin 451 (175), die sich in der Tertiärstruktur in unmittelbarer Nachbarschaft befinden und als katalytische Triade bezeichnet werden. (Die erste Zahl gibt die Aminosäurepositionen im Präprokathepsin F an (Santamaría *et al.* 1999), die Zahl in Klammern die im reifen Papain (Brocklehurst *et al.* 1987). Die Thiolgruppe des Cysteinylrestes wird durch den Imidazolring des Histidin ionisiert (Thiolat-Imidazol-Ionenpaar), so dass nukleophile Attacken auf Carbonylkohlenstoffe des Substrates möglich werden.

Im Gegensatz zu dem eben beschriebenen weitgehend einheitlichen Aufbau der reifen Enzyme (Coulombe *et al.* 1996, LaLonde *et al.* 1999, Kaulmann *et al.* 2006), unterscheiden sich die Primärstrukturen der Proregionen in der Papain-Familie teilweise erheblich. Diese Unterschiede ermöglichen eine Einteilung in drei Unterfamilien: Kathepsin-L-ähnliche Proteasen besitzen eine ca. 100 Aminosäuren lange Proregion mit den Motiven ERF/WNIN und GNFD (Karrer *et al.* 1993). Die Proregionen der Kathepsin-B-ähnlichen Proteasen haben lediglich

ungefähr 60 Aminosäuren und verfügen nur über das GNFD-Motiv (Kirschke *et al.* 1995). Kathepsin F gehört gemeinsam mit dem Kathepsin W, mit dem es 58 % Homologie bezüglich der Aminosäuresequenz aufweist, zur dritten Unterfamilie der humanen Papain-ähnlichen Cysteinproteasen (Wex *et al.* 1999). Sie enthalten in der Proregion das ERFNAQ- statt des ERF/WNIN-Motivs. Abb. 1 verdeutlicht die Verwandtschaftsbeziehungen der drei Unterfamilien.

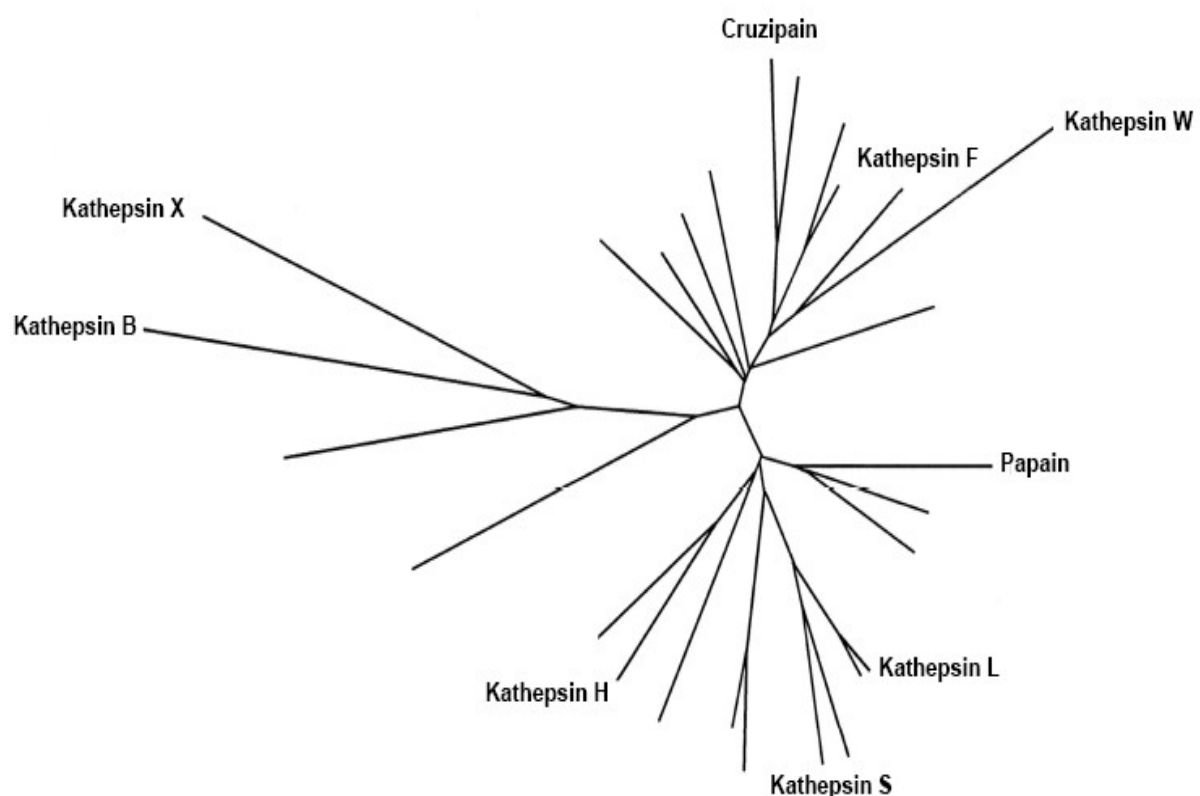


Abb. 1: Stammbaum zur Verwandtschaft einiger bekannter Kathepsine der Papainfamilie

Der Stammbaum wurde von Brinkworth und Mitarbeitern berechnet (Brinkworth *et al.* 2000). Die Beschriftung der Abbildung wurde ins Deutsche übersetzt und vereinfacht. Deutlich sichtbar sind die drei Unterfamilien: Kathepsin-B-ähnliche (u.a. Kathepsin B und Kathepsin X), Kathepsin-L-ähnliche (z.B. Kathepsin L, Kathepsin S, Kathepsin H) und die Kathepsin-F-ähnlichen Cysteinproteasen (Kathepsin F und Kathepsin W).

Interessanterweise werden die Kathepsine F und W auf dem Chromosom 11, nah beieinander in der Region q13, kodiert (Santamaría *et al.* 1999). Neben den Kathepsinen S und K auf dem Chromosom 1 sowie den Kathepsinen L und V auf dem Chromosom 9 bilden sie das

dritte bisher bekannte Paar von Kathepsinen, die im menschlichen Genom in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander kodiert werden (Wex *et al.* 1999). In direkter Nähe zum Gen des Kathepsin F befindet sich auch das Gen für Cystatin M (Stenman *et al.* 1997). Es wird vermutet, dass die genetische Information des humanen Kathepsin F Produkt einer Genduplikation des Kathepsin W sowie des Cystatin M mit anschließender Fusion dieser duplizierten Gene ist (Bühling *et al.* 2000).

Das Propeptid des Cruzipains, der Haupt-Cysteinprotease von *Trypanosoma cruzi*, ist ein sehr effizienter Inhibitor des humanen Kathepsin F (experimentiert wurde mit der in *P. pastoris* produzierten unvollständigen Form, wie es von Wang *et al.* 1998 beschrieben wurde), hemmt jedoch kaum Kathepsin-L-ähnliche Proteasen (Reis *et al.* 2006). Das passt zur engen Verwandtschaft der Cruzipaine und der Kathepsin-F-ähnlichen Cysteinproteasen, wie sie in Abb. 1 sichtbar ist.

4.2 Kathepsin F, ein Vertreter der Cysteinproteasen

Eine Besonderheit des Kathepsin F liegt in seiner außergewöhnlich langen Proregion mit 251 Aminosäuren. Eine längere Proregion ist bei den bekannten Cysteinproteasen der Säugetiere noch nicht nachgewiesen worden. Sie kann in drei Abschnitte unterteilt werden. N-terminal befindet sich ein Bereich, der starke Homologie zum Cystatin, einem lange bekannten Inhibitor von Cysteinproteasen (Turk and Bode 1991), aufweist und folglich als Cystatin-ähnliche-Domäne bezeichnet wird. Die Identität mit dem Prototyp, dem Hühnerei-Cystatin, beträgt 27 %. Die Cystatin-ähnliche-Domäne ist durch ein 50 Aminosäuren langes flexibles Verbindungsstück mit einer zweiten Domäne (95 Aminosäuren) verbunden, die den Proregionen der Kathepsine W (69 % Homologie) und L (47 % Homologie) ähnelt und deshalb nachfolgend als „klassische“ Proregion bezeichnet wird. Es ist bemerkenswert, dass bisher keine bekannte Cysteinprotease eine Proregion mit zwei Domänen, die das reife Enzym potentiell inhibieren können, aufweist. Deshalb wurde vermutet, dass das Kathepsin F in einen Schlüsselprozess des Stoffwechsels eingebunden ist, der gut reguliert werden muss (Nägler *et al.* 1999¹). Neben dem Hühnerei-Cystatin sind Cystatin C, Equistatin, L-Kininogen und im geringen Maße Stefin A natürliche Inhibitoren des Kathepsin F (Fonovič *et al.* 2004) und anderer Cysteinproteasen (Turk *et al.* 2001).

Humanes Prokathepsin F verfügt über fünf mögliche N-Glykosylierungsstellen, zwei in der Proregion (141p, 176 p) und drei im reifen Abschnitt (97, 108, 170) (Nägler *et al.* 1999¹). Im reifen Enzym sind fünf Disulfidbrücken vorhanden; für das Proenzym gibt es aufgrund dessen, dass seine heterologe Expression bisher noch nicht gelungen ist, keine zuverlässigen Angaben. Ein hoch konserviertes 9 Aminosäuren langes Motiv für den Mannose-6-Phosphat-unabhängigen Transport in die Lysosomen fehlt dem Kathepsin F ebenso wie den Kathepsinen B, X und dem Baculovirus-Kathepsin (Wiederanders *et al.* 2003). Abb. 2 zeigt ein Modell der räumlichen Struktur des reifen Enzyms.

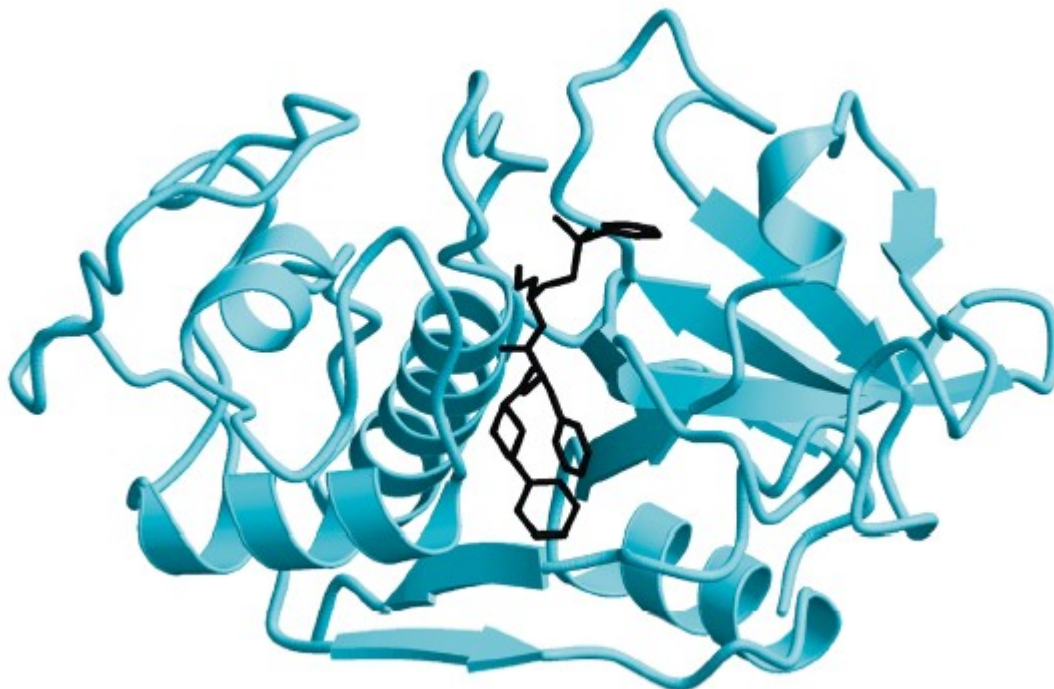


Abb. 2: Modell der räumlichen Struktur des humanen reifen Kathepsin F

Die Abbildung wurde aus einer Veröffentlichung von Somoza *et al.* 2002 entnommen. Das reife Enzym besteht aus einer L-Domäne mit drei α -Helices und einer R-Domäne mit zwei α -Helices und einem β -Faltblatt. Die Kristallisation erfolgte zusammen mit einem speziell für das Kathepsin F entwickelten Inhibitor, dessen Struktur sich schwarz gekennzeichnet im aktiven Zentrum befindet.

Kathepsin F wird konstitutiv in fast allen menschlichen Geweben exprimiert. So sind hohe Konzentrationen in Herz- und Skelettmuskulatur, im Gehirn, im Hoden und Ovar und moderate Konzentrationen in der Prostata, der Plazenta, der Leber und im Kolon gemessen worden. Nicht nachweisbar war diese Protease bisher in Thymozyten und T-Lymphozyten (Wang *et al.* 1998). Die hohen Konzentrationen in den Gonaden lassen sich mit Aufgaben im Rahmen der

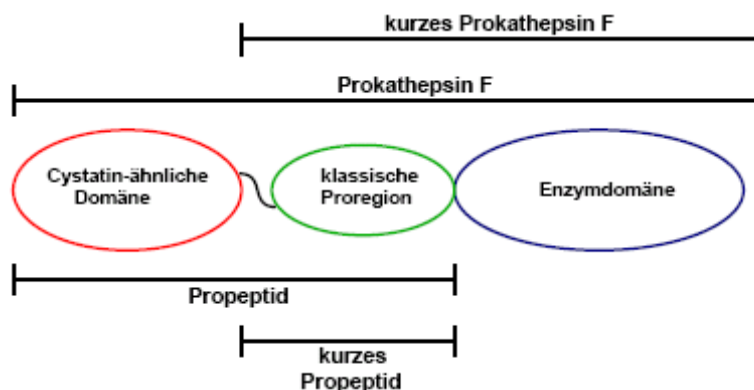
Fertilität in Verbindung bringen (Santamaría *et al.* 1999). Wie Kathepsin S (Riese *et al.* 1996, Shi *et al.* 1999, Villadangos *et al.* 1999), spielt Kathepsin F wahrscheinlich auch eine Rolle bei der Maturation von MHC-Klasse-II-Komplexen, indem es selektiv in Makrophagen die Degradation der invarianten Kette in ein Peptid mit einer Größe von 3 kDa namens CLIP (class II-associated invariant chain peptide) katalysieren kann (Shi *et al.* 2000). Kultivierte Makrophagen können außerdem aktives Kathepsin F sezernieren, welches Apolipoprotein B-100 von LDL-Partikeln in der Tunica intima von Blutgefäßen degradiert und somit ihre Aggregation fördert. Tatsächlich finden sich erhöhte Kathepsin-F-Konzentrationen im entzündlichen Infiltrat der arteriosklerotischen Plaques (Öörni *et al.* 2004). Die Sekretion von Kathepsin F in den Plaques kann durch Angiotensin II, welches nachweislich zur Entstehung der Arteriosklerose beiträgt, ausgelöst werden (Lindstedt *et al.* 2003, Kaakinen *et al.* 2007). Verschiedene humane Krebs-Zelllinien überexprimieren und sezernieren Kathepsin F, wie z.B. HeLa-Zellen, Melanome, K-562-Zellen, Lungenkrebszellen (Santamaría *et al.* 1999) und Zervixkarzinomzellen (Vazquez-Ortiz *et al.* 2005). Dazu passt die Beobachtung, dass in zahlreichen Tumoren die Region q13 auf dem Chromosom 11 strukturelle Abberationen aufweist (Santamaría *et al.* 1999). Auch das Fehlen des aktiven Kathepsin F kann zu Erkrankungen führen, z.B. ist bei einigen angeborenen Erkrankungen wie dem Meckel-Syndrom, der Osteopetrose sowie der kongenitalen Fibrose der extraokulären Muskulatur die entsprechende Kathepsin-F-Chromosomenregion verändert (Wex *et al.* 1999). Weiterhin könnte Kathepsin F eine Ursache für sich spät manifestierende neurologische Krankheiten sein. So wurde zumindest in Kathepsin-F-Knock-out-Mäusen gezeigt, dass mit höherem Lebensalter der Mäuse eine signifikant höhere neuronale Gliose und Lipofuszinose mit Schwierigkeiten der Koordination, Tremor und spastischen Bewegungen auftraten (Tang *et al.* 2006).

Diese Aufzählung zeigt, dass gegenwärtig und vermutlich auch noch in den nächsten Jahren die Aufklärung der physiologischen und pathophysiologischen Bedeutung des Kathepsin F für den menschlichen Organismus aussteht, unter anderem auch die Suche nach weiteren *in vivo*-Substraten. Dabei werden Erkenntnisse aus der Grundlagenforschung durchaus nützlich sein, nicht zuletzt auch zur funktionellen Bedeutung der ungewöhnlichen Multidomänen-Struktur seiner Proregion.

5. ZIELE DER ARBEIT

Das humane Kathepsin F ist das bisher einzige bekannte Kathepsin, das eine Proregion mit zwei strukturell und vermutlich auch funktionell verschiedenartigen Domänen aufweist: eine mit weitgehender Homologie zur Proregion verwandter Proenzyme und zusätzlich N-terminal eine so genannte Cystatin-ähnliche Domäne (Nägler *et al.* 1999). Cystatine sind unspezifische hochaffine Inhibitoren von Cysteinproteasen, kommen im Extrazellularraum vor und begrenzen dort *in vivo* deren proteolytische Aktivität zeitlich und räumlich (Keilová and Tomášek 1974, Anastasi *et al.* 1983, Abrahamson *et al.* 1987, Björck *et al.* 1989, Mason *et al.* 1998, Bobek and Levine 1992). Diese Fähigkeit zur Hemmung der enzymatischen Aktivität ist auch charakteristisch für die Propeptide vieler bisher untersuchter Kathepsine wie Kathepsin B, Kathepsin L, Kathepsin S und Kathepsin K (Bühling *et al.* 2000). Die Proregion des Kathepsin F verfügt demzufolge über zwei potentiell inhibitorische Domänen für das reife Enzym, jedoch gibt es zur funktionellen Bedeutung dieser Redundanz bisher nur Spekulationen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die gentechnische Herstellung von vier Proteinen mit Teilsequenzen des humanen Prokathepsin F in *E. coli*: des Prokathepsin F, vollständig und als verkürzte Form ohne Cystatin-ähnliche Domäne, und der Proregion, ebenfalls in vollständiger und verkürzter Form (siehe Schema 1). Durch Renaturierung und Prozessierung zumindest eines der beiden Zymogene sollte das reife Enzym gewonnen und zu Hemmstudien mit den beiden unterschiedlich langen Propeptiden genutzt werden. Auf diese Weise sollten Informationen zu den funktionellen Eigenschaften der zwei Domänen der Proregion erhalten werden. Von anderen Kathepsinen standen die reifen Enzyme (z. B. Kathepsin L) oder die Propeptide (z. B. vom Kathepsin W) zur Verfügung. Damit waren noch Messungen der Kreuzreaktivität der inhibitorischen Wirkung zwischen Propeptiden und Enzymen geplant, um Informationen zu den verwandtschaftlichen Beziehungen auf der funktionellen Ebene innerhalb und zwischen den Unterfamilien der Papain-ähnlichen Cysteinproteasen zu erhalten.



Schema 1: Geplante Expressionsprodukte des Kathepsin F

6. MATERIALIEN UND METHODEN

6.1 Materialien

6.1.1 Enzyme, Substrate und Antibiotika

In der folgenden Tab. 1 sind sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Enzyme, Substrate und Antibiotika zusammengestellt.

Tab. 1: Übersicht über verwendete Antibiotika, Substrate, Enzyme und weitere Reagenzien

Restriktionsenzyme	Aktivität	Hersteller
Nde I	10 U/ μ l	Fermentas
Hind III	10 U/ μ l	Fermentas
Bam H I	10 U/ μ l	Fermentas
Eco R I	10 U/ μ l	Fermentas
weitere Enzyme	Aktivität/Konzentration	Hersteller
T ₄ -DNA-Ligase	5 Weiss-Units/ μ l	Fermentas
Taq-DNA-Polymerase	5 U/ μ l	Invitrogen
Pfu-Polymerase	2,5 U/ μ l	Fermentas
Pepsin aus Schweine- magen	verwendet als 1 mM Stammlösung in 1 % DMSO und 100 mM Zitratpuffer pH 4.0	Serva
Kathepsin H	3,21 U/ μ l	Athens Research & Technology
Kathepsin L	15,24 nM	eigene Arbeitsgruppe (Kramer <i>et al.</i> 2007)
Kathepsin S	13,57 nM	eigene Arbeitsgruppe (Kramer <i>et al.</i> 2007)
Substrate	Spezifikum	Hersteller
Z-Phe-Arg-AMC	verwendet als 2, 6, 10, 20 und 40 mM Stammlösung in DMSO	Bachem GmbH
Z-Leu-Arg-AMC	verwendet als 10 mM Stammlösung in DMSO	Calbiochem/Novabiochem
Z-Val-Val-Arg-AMC	verwendet als 40 mM Stammlösung in DMSO	Bachem GmbH
H-Arg-AMC	verwendet als 10 mM Stammlösung in DMSO	Bachem GmbH

Antibiotika		Hersteller
Ampicillin		Roth
Chloramphenicol		Roth
weitere Reagenzien	Spezifikum	Hersteller
IPTG		Roth
E64	verwendet als 700 µM Stammlösung in H ₂ O	Bachem GmbH
X-Gal	verwendet als Lösung (40 mg/ml) in DMF	Eppendorf
Yellow Sub™	PCR-Additiv zur Verbesserung von Ausbeute und Spezifität	GENEO GmbH, Hamburg

6.1.2 Medien und Puffer für molekularbiologische Techniken

Nachstehend aufgeführte Medien wurden zur Kultivierung der *E. coli*-Stämme verwendet. Sie wurden jeweils 20 min bei 120 °C autoklaviert.

LB-Medium:

10 g/l Bactotrypton; 10 g/l NaCl; 5 g/l Hefeextrakt; auf pH 7.4 eingestellt

LB-Agar:

15 g/l Bacto-Agar; 10 g/l Bactotrypton; 10 g/l NaCl; 5 g/l Hefeextrakt; auf pH 7.2 eingestellt

SOB-Medium:

20 g/l Bactotrypton; 10 g/l NaCl; 5 g/l Hefeextrakt; auf pH 7.0 eingestellt

SOC-Medium:

20 g/l Bactotrypton; 5 g/l Hefeextrakt; 0,5 g/l NaCl; 10 mM MgCl₂; 20 mM Glukose; eingestellt auf pH 7.0

50 x TAE-Puffer:

40 mM Tris-Acetat; 1mM EDTA; pH 8.3

151,6 mM PBS:

8 g NaCl; 3,63 g Na₂HPO₄ x12 H₂O; 0,24 g KH₂PO₄; 0,2 g KCl; auf pH 7.2 eingestellt und mit Aqua dest. auf 1 l Volumen aufgefüllt

Puffer W:

100 mM Tris/HCl pH 8.0; 1mM EDTA; 0,02 % NaN₃

Puffer X:

100mM Tris/HCl pH 8.0; 1mM EDTA; 1% Triton

10 mM dNTP-Mischung (Boehringer Mannheim):

10 mM dATP; 10 mM dCTP; 10 mM dGTP; 10 mM dTTP

10 x PCR-Puffer (Fermentas):

800 mM Tris/HCl pH 8.9; 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 50 mM MgCl_2

10 x Puffer für T₄-DNA-Ligase (Fermentas):

400 mM Tris/HCl; 100 mM MgCl_2 ; 100 mM DTT; 5 mM ATP

Weitere hier nicht aufgeführte Reagenzien sind der Beschreibung der Methoden zugeordnet. Alle anderen, in dieser Arbeit nicht aufgeführten Reagenzien und Materialien stammten von verschiedenen Herstellern und hatten mindestens den Reinheitsgrad pro analysi.

6.1.3 Reagenziensätze zur Bearbeitung von DNA

Für die Elution von Agarosegelen wurde der QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen, für Plasmidisolierungen der NukleoSpin Plasmid Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet. Zur Klonierung kam das System zum TOPO TA Cloning von Invitrogen zum Einsatz. Bei der Sequenzierung wurde auf den Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit von Amersham Biosciences oder auf den Advantage Read der SEQLAB Göttingen zurückgegriffen.

6.1.4 Bakterienstämme und Vektoren

6.1.4.1 Klonierungsstamm *E. coli* TOP10 (Invitrogen)

Dieser *E. coli*-Stamm wurde für Klonierungen und Subklonierungen des Inserts (sogenanntes TOPO/TA-Cloning) und Blau/Weiß-Selektion (mit dem Vektor pCR 2.1-TOPO) verwendet.

6.1.4.2 Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Invitrogen)

Dieser Stamm wurde zur Überexpression der Proteine verwendet. Im Plasmid pLysS ist die genetische Information für das T7-Lysozym, welches die T7-RNA-Polymerase inaktiviert und eine basale Transkription eines Inserts blockiert, und das Chloramphenicol-Resistenzgen enthalten. Der verwendete Expressionsvektor pRSET-B ist durch den T7-Promotor induzierbar. Das Gen für die T7-Polymerase ist allerdings nicht im Genom von *E. coli* enthalten, sondern

in dem lysogenen Phagen λ DE3. Das Phagen genom codiert auch einen lac-Repressor, der zunächst die Transkription des Inserts und der T7-Polymerase blockiert. Durch IPTG wird der lac-Repressor inaktiviert und die Transkription des Inserts ermöglicht.

6.1.4.3 Expressionsstamm *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS (Novagen)

Es handelt sich um einen speziellen Expressionsstamm, der prinzipiell die gleichen Eigenschaften wie der Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) pLysS besitzt, jedoch das Plasmid pLysS RARE trägt, auf dem neben dem T7-Promotor und der Chloramphenicolresistenz auch sechs seltene tRNAs kodiert sind. Dadurch ist er in der Lage, die im Zytosol von *E. coli* nur in geringer Konzentration vorhandenen tRNAs für die Bindung der Aminosäuren Arg, Ile, Gly, Leu und Pro zu produzieren.

6.1.4.4 Klonierungsvektor pCR2.1-TOPO (Invitrogen)

Er enthält ca. 3,9 kbp und wurde beim TOPO/TA-Cloning zur Blau/Weiß-Selektion verwendet. Die MCS befindet sich im lac-Z-Gen des Vektors. Eine Ansicht zum grundsätzlichen Aufbau ist in der folgenden Abb. 3 dargestellt.

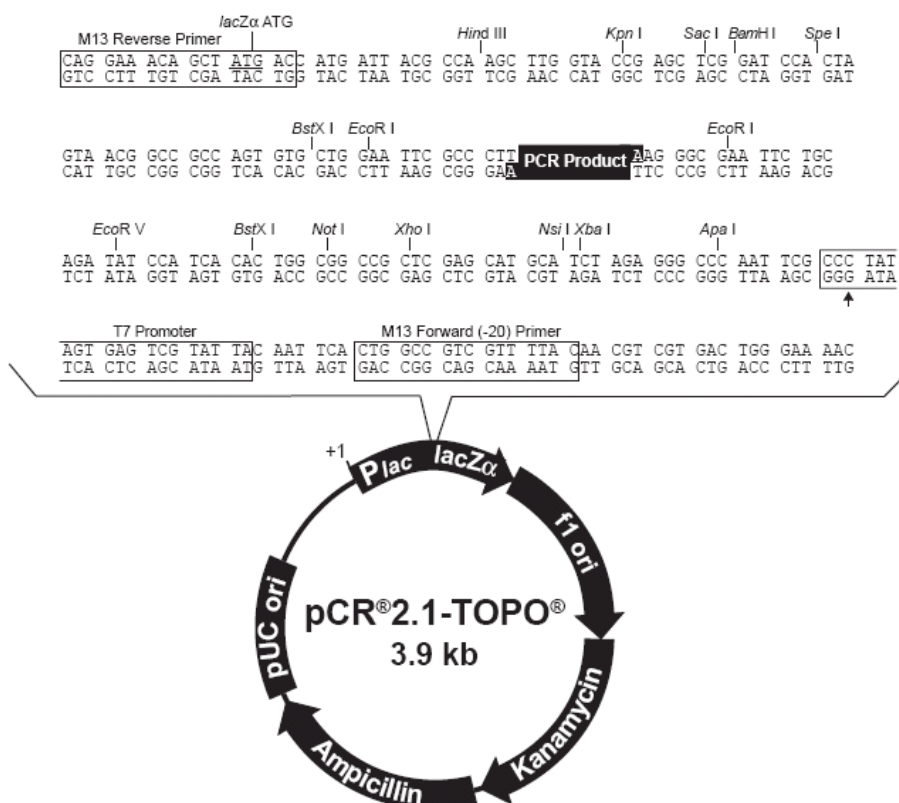


Abb. 3: MCS und Aufbau des Vektors pCR2.1-TOPO

Genutzt wurde für diese Arbeit die Ampicillinresistenz. Mit den Primern wurden die Schnittstellen für Nde I und Hind III eingeführt (siehe Tab. 2).

6.1.4.5 Expressionsvektor pRSET-B (Invitrogen)

Der Vektor steht unter Kontrolle des T7-Promoters, der mit IPTG induzierbar ist. Auch er enthält wie der Vektor pCR2.1-TOPO ein Gen zur Ampicillinresistenz, welches ebenfalls genutzt wurde, sowie die Schnittstellen für Hind III und Nde I. Abb. 4 zeigt die MCS des Expressionsvektors.

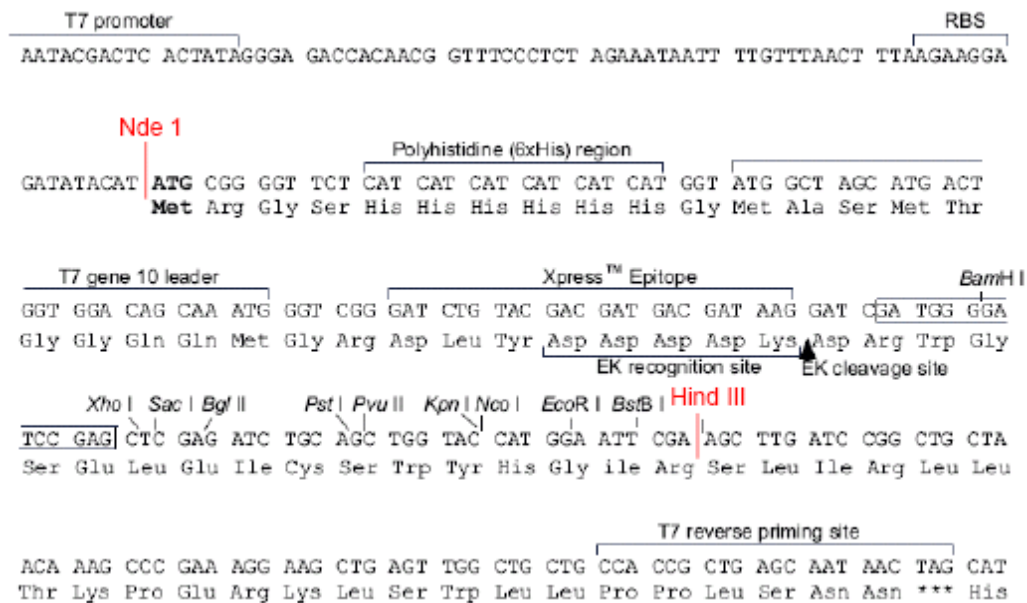


Abb. 4: MCS des Expressionsvektors pRSET-B

Die für die Klonierung und Umklonierung genutzten Schnittstellen für Nde I und Hind III sind rot hervorgehoben.

6.1.5 Geräte

6.1.5.1 Grundausrüstung

Für die Messungen und Einstellungen des pH standen das pH-Meter CG 840 der Firma Schott mit der Mikroglaselektrode SenTix von WTW zur Verfügung.

Es wurde mit verstellbaren Ein- und 12-Kanal-Hubkolbenpipetten von 2,5 µl bis 2500 µl (Eppendorf) pipettiert.

Weiterhin wurde mit folgenden Geräten gearbeitet: Vortex Genie 2 (Scientific Industries), Vortexer VF2 (IKA Labortechnik), Mikrowellenherd der Firma AEG, den Thermostaten RB-5A (Techne), F10 (Julabo) und E1 (Medingen), dem Thermoblock DB 2A (Techne) und dem Thermocycler PTC-100 (MJ Research, Inc), der Waage MC1 (Sartorius), der Zentrifuge 5403

(Eppendorf) und der Zentrifuge RC-5B (Sorvall), den Tischzentrifugen 5417R (Eppendorf) und MC 12V (Sorvall) sowie der Ultrazentrifuge L70 mit Rotor SW 28 (Beckmann).

6.1.5.2 Gentechnische Arbeitsmittel

Kultivierung, Aufschluss der Bakterienzellen und Fraktionierung der Zellbestandteile wurden unter Verwendung folgender Geräte durchgeführt: Brutschrank (Heraeus), Schüttel-Inkubator 3032 (GFL), Rotary Mixer (Labinco), Ultraschall-Desintegrator Bandelin Sonoplus HD70 (Bandelin Elektronik) und Gradientenmischer (Werkstatt der Medizinisch-theoretischen Institute).

6.1.5.3 Enzymologische Arbeitsmittel

Die fluorometrischen Messungen erfolgten zum Teil an dem Luminescence Spectrometer LS 50 B (Perkin Elmer) unter Verwendung von Quarzglas-Küvetten mit 2 ml Probenvolumen und 1x1 cm Schichtdicke (Hellma). Aufgrund des hohen Einsatzes an Volumen werden diese Messungen in dieser Arbeit als Makrotests bezeichnet. Meist wurden zur Einsparung von Material und Zeit Mikrotests in 96-Well-Platten durchgeführt, wobei zur Messung die Mikrotiterplattenfluorometer Spectra Max Gemini (Molecular Devices) und Infinite M200 (Tecan) dienten. Dabei wurden sowohl V-Mikrotiterplatten mit maximal 220 µl Fassungsvermögen (Hard-Shell™ Thin-Wall, weiß, von der Firma MJ Research) als auch F-Mikrotiterplatten für 350 µl Volumen (FIA-Platten, 96 Well, weiß, von Greiner Bio-One) verwendet.

6.2 Methoden

6.2.1 Molekularbiologische Methoden

6.2.1.1 Amplifikation von DNA

Die Amplifikation der Prokathepsin-F-DNA-Sequenzen erfolgte durch PCR unter Verwendung der Pfu-Polymerase. Das genetische Material wurde von Dorit K. Nägler zur Verfügung gestellt.

Tab. 2 zeigt die dazu verwendeten Primer, wobei die Start- (für die sense-Primer) bzw. die Stoppcodons (für die antisense-Primer) fett gedruckt sind. Blau ist die Schnittstelle für Nde I, grün die für Hind III dargestellt.

Tab. 2: Oligonukleotid-Primer zur PCR-Amplifikation von Prokathepsin-F-Sequenzen

zugehöriges Protein / Peptid	sense-Primer	antisense-Primer
Prokathepsin F	5'-GA CAT ATG GCC CCC GCC CAG-3'	5'- G GAA GCT TCA GTC CAC CAC CG -3'
kurzes Prokathepsin F	5'- TC CAT ATG TTG AAT GAG GAT CCC CT -3'	5'- G GAA GCT TCA GTC CAC CAC CG -3'
Propeptid des Kathepsin F	5'-GA CAT ATG GCC CCC GCC CAG-3'	5'- AGA AGC TTA GAG GTC ACC CAC AG -3'
kurzes Propeptid des Kathepsin F	5'- TC CAT ATG TTG AAT GAG GAT CCC CT -3'	5'- AGA AGC TTA GAG GTC ACC CAC AG -3'

Der untenstehenden Tab. 3 sind die Reaktionsansätze der PCR und die Annealingtemperaturen zu entnehmen.

Tab. 3: PCR-Bedingungen für die Amplifikation ausgewählter Prokathepsin-F-Sequenzen

	verkürztes Proenzym	verkürztes Propeptid
Template- DNA	1 µl (10 ng)	1 µl (10 ng)
10 mM dNTP-Mischung	1,5 µl	1 µl
Sense-Primer (10 µM)	3 µl	2 µl
Antisense-Primer (10 µM)	3 µl	2 µl
10 x PCR-Puffer mit 20 mM MgSO ₄	7,5 µl	5 µl
Wasser	58 µl	33,3 µl
Additiv Yellow Sub™	-	5 µl
Pfu-Polymerase	1 µl	0,7 µl
Gesamtvolumen	75 µl	50 µl
Annealingtemperatur	46 °C	50 °C
Größe	945 bp	302 bp

Für beide DNA-Sequenzen wurde derselbe Programmablauf im PCR-Cycler gewählt: Im 1. Schritt erfolgte die DNA-Denaturierung über 3 min bei 95°C, danach (Schritt 2) das Annealing für 48 sec und anschließend (Schritt 3) die Elongation über 1 min bei 72 °C. Die Denaturierung der gebildeten Doppelstränge (Schritt 4) erfolgte bei 95 °C über 20 sec. Die beschriebenen Schritte 2–4 wurden 30-mal wiederholt. Die letzte Elongation dauerte 5 min, danach senkte das Programm die Temperatur auf 4 °C.

6.2.1.2 Anfügen von dA-Überhängen

Da die in der PCR verwendete Pfu-Polymerase nur blunt-Ends der DNA-Fragmente produziert, für die Ligation in den Klonierungsvektor pCR 2.1-TOPO allerdings sticky-Ends benötigt wurden, war es notwendig, jeweils ein dA-Nukleotid an die 3'-Enden der PCR-Produkte anzufügen. Dazu wurden folgende Ansätze pipettiert:

1 µl gereinigtes PCR-Produkt
0,4 µl 50 mM MgCl ₂
0,1 µl Taq-Polymerase
1 µl 10 x PCR-Puffer
0,25 µl dATPs (je 10 mM)
<u>7,25 µl Wasser</u>
= 10 µl Gesamtvolumen

Dieser Ansatz inkubierte im Wasserbad bei 72 °C für 15 min.

6.2.1.3 Herstellen der Plasmid-Vektoren und Transformation kompetenter Bakterienzellen

Zur Ligation mit dem Klonierungsvektor pCR 2.1-TOPO wurde untenstehender Ansatz vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert; anschließend wurde auf 4 °C abgekühlt.

frisches PCR-Produkt: 0,5–4 µl
TOPO-Vector: 1 µl
Salzlösung: 1 µl
mit Wasser auffüllen auf 6 µl Gesamtvolumen

Zur Blau/Weiß-Selektion wurden kompetente *E. coli* TOP 10 mit 100–200 ng DNA des Vektors pCR2.1-TOPO mittels Hitzeschock transformiert (Sambrook *et al.* 1989). Nach 30–60 min Regenerationszeit in LB-Medium ohne weitere Zusätze bei 37 °C wurden die transformierten Zellen auf LB-Agarplatten mit 64 µg/ml X-Gal ausplattiert. Die weißen Klone wurden nach Inkubation über Nacht gepickt und erneut angeimpft.

Bei der Ligation des Inserts mit dem Expressionsvektor pRSET-B betrug das Stoffmengenverhältnis 3/1. Folgender Ansatz wurde in PCR-Tubes pipettiert:

1 µl pRSET-B
x µl Insert (konzentrationsabhängig)
2 µl 10 x Puffer T₄-DNA-Ligase
0,5 µl T₄-DNA-Ligase
= 20 µl Gesamtvolumen

Die Reaktion erfolgte im Thermocycler und begann mit der Ligation bei 22 °C über 1 h. Danach erfolgte die Denaturierung der T₄-DNA-Ligase bei 65 °C über 14 min. Am Ende wurde wieder auf 22 °C abgekühlt.

Anschließend wurden 100 µl kompetente *E. coli* BL 21 (DE3) pLysS-Zellen mit 1–10 ng/µl Plasmid für 5–30 min im Eisbad inkubiert. Es erfolgte danach im Wasserbad ein Hitzeschock über 45 sec bei 42 °C. Die Mischung wurde wieder ins Eisbad gestellt (2 min), dann mit 250 µl SOC-Medium (dieses hatte Raumtemperatur) verdünnt und 60 min im Brutschrank bei 37 °C und unter Schütteln (250 rpm) inkubiert. Diese Vorkultur wurde auf LAC-Platten ausgestrichen, die dann über Nacht im Brutschrank bei 37 °C temperiert wurden.

6.2.1.4 Restriktionsverdau und Größenbestimmung der Spaltstücke

Die Restriktion der gereinigten Plasmid-DNA erfolgte unter Wahl geeigneter Restriktionsenzyme und Puffer. Die eingesetzten Enzyme und die entsprechenden Puffer bei den verschiedenen Plasmiden sind in der folgenden Tab. 4 dargestellt.

Tab. 4: Übersicht über die für diese Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme

<i>E. coli</i> -Stamm	Plasmid	Restriktionsenzyme	Restriktionspuffer
TOP 10	pCR 2.1-TOPO	Nde I und Hind III	10 x Puffer R+ (Fermentas)
TOP 10	pCR 2.1-TOPO	Bam H I und Hind III	Puffer Y+ Tango (Fermentas)
BL21 (DE3) pLysS	pRSET-B	Nde I und Hind III	10 x Puffer R+ (Fermentas)
BL21 (DE3) pLysS Rosetta	pRSET-B	Nde I und Hind III	10 x Puffer R+ (Fermentas)

0,5–1 µg DNA wurde mit 1/3-Volumen 10 x Puffer und 1/10-Volumen der Restriktionsenzyme (10 U/µl) versetzt und inkubierte mindestens 1 h bei 37 °C im Brutschrank. Danach erfolgte eine Agarosegelelektrophorese unter Mitführen einer ungeschnittenen Kontrolle bei 100 V über 45 bis 60 min.

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese wurden 1 bis 2 %ige Gele, die mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zur Sichtbarmachung der DNA im ultravioletten Licht versetzt wurden, verwendet. Sie erfolgte als horizontale Elektrophorese in 1 x TAE-Puffer als Laufpuffer. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit einem 1/5-Volumen DNA-Laufpuffer (von Fermentas bzw. selbst angesetzt) versetzt. Zur Größenbestimmung wurden die Molekulargewichtsstandards GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas) und der 1 kb DNA Ladder (Invitrogen) als Referenz verwendet.

6.2.1.5 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA erfolgte nach Sanger unter Verwendung des Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit nach Herstellerangaben. Für alle Konstrukte wurden die Primer IR 8 (5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3', sense) und IR 9 (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3', anti-sense) genutzt. Sie binden außerhalb des zu analysierenden Inserts an das Plasmid.

6.2.1.6 Expression im analytischen Maßstab

Die Testexpression erfolgte in 30 ml Selektivmedium mit 50 ng/µl Ampicillin und 35 ng/µl Chloramphenicol, das mit 600 µl einer Übernachtskultur angeimpft wurde. Diese Vor- kultur wuchs bei 37 °C unter Schütteln (200 rpm), bis eine OD₆₀₀ von 0,4–0,6 (bei

1 cm Schichtdicke) erreicht worden war. Nun wurde mit 1 mM IPTG induziert und nach jeweils 1, 2 und 3 h Proben entnommen. Durch erneute Messung der OD₆₀₀ konnten Veränderungen der Zelldichte ermittelt und bei der Wahl des zu analysierenden Volumens berücksichtigt werden. Eine optische Dichte von 1 entspricht einer Zelldichte von 8×10^8 Zellen/ml (Sambrook *et al.* 1989); bei Entnahme des zur OD₆₀₀ reziproken Volumens (in ml) ergibt sich folglich jeweils die gleiche Zellzahl von 8×10^8 im entnommenen Probenvolumen.

Die elektrophoretische Auswertung der Testexpression erfolgte getrennt für drei Fraktionen, die durch Zentrifugationen (Eppendorf-Tischzentrifuge 4 °C, max. Drehzahl) gewonnen wurden. Im Überstand nach der ersten Zentrifugation (1 min) befanden sich die sezernierten Proteine. Das Pellet wurde in PBS resuspendiert und zum Zellaufschluss alternierend 4-mal in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei 42 °C wieder aufgetaut. Nach der zweiten Zentrifugation (10 min) befand sich das lösliche Zellprotein im Überstand, im Pellet blieben die unlöslichen Zellproteine zurück. Die Proben wurden mit Probenpuffer vermischt bzw. resuspendiert und dann im Wasserbad bei 95 °C 5 min denaturiert. Vor dem Auftrag auf die SDS-PAGE wurde nochmals kurz zentrifugiert, um Aggregate zu entfernen.

6.2.1.7 Expression im präparativen Maßstab

Die Expression erfolgte mit dem Stamm *E. coli* BL21 (DE3) pLysS nach Verdünnen von 6 ml einer Übernachtskultur mit 300 ml Selektivmedium (50 µg/ml Ampicillin und 35 µg/ml Chloramphenicol). Diese Vorkultur wuchs bei 37 °C unter 200 rpm im Schüttler, bis eine OD₆₀₀ von 0,4–0,6 erreicht worden war. Es wurde mit 1 mM IPTG der T7-Promotor induziert. Nach 3 h unter weiterer Inkubation im Schüttler erfolgte die Ernte. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (10 min, 4 °C, bei 6000 rpm, Sorvall Rotor GS3) sedimentiert und anschließend in Puffer W resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall (3x2 min kontinuierlich mit 60 % Intensität, Intervall 0,8/sec) im Eisbad. Eine erneute Zentrifugation (10 min bei 4 °C und 6000 g, Sorvall Rotor SS34) trennte die Zellbestandteile in lösliche und unlösliche. Das Pellet wurde zur Entfernung von Membranpartikeln mit Puffer X behandelt (30 min bei 4 °C). Danach wurde wieder zentrifugiert (10 min, 9000 rpm, Sorvall Rotor SS34). Die sedimentierten unlöslichen Proteine wurden 30 min bis 1 h lang in 6 M GdnHCl mit 50 mM Natriumacetatpuffer pH 4.5 gelöst, die Auflösung des Pellets wurde durch Eintauchen des Zentrifugenröhrchens in ein Ultraschallbad beschleunigt.

6.2.2 Computerprogramme und Datenbanken

Diese Arbeit entstand mit Hilfe der Programme bzw. Programmpakete Microsoft Office (Microsoft Corp.) und Open Office Org. 2.2, SigmaPlot 10.0 (SPSS Inc.) und Aida Version 3.11. Prism 4.0 (Graph Pad) wurde zu Berechnungen mittels linearer und nichtlinearer Regression sowie zur Darstellung der Grafiken verwendet. Informationen zum Kathepsin F wurden mit Hilfe der Datenbank Expasy (ProtSwiss) gewonnen.

Bei der Versuchsplanung wurde häufig mit zentral zusammengesetzten faktoriellen Versuchsplänen 2. Ordnung gearbeitet (Rasch *et al.* 1999). Sie haben den Vorteil, bei der Prozessoptimierung den durch nichtlineare Abhängigkeiten und Wechselwirkungen der Einflussfaktoren zu erwartenden hohen Messaufwand bei der Realisierung eines vollständigen Versuchsplanes deutlich zu verringern. Untersucht man z.B. den Einfluss von 3 Faktoren auf die Renaturierung in jeweils 4 Konzentrationsstufen, hätte das eine Messung von $4^3 = 64$ Proben bedeutet. Die Auswertung erfolgte durch Bestimmung einer sogenannten Wirkfläche mittels multipler Regression (unter Verwendung der Gleichung 1). Abb. 5 zeigt im Teil B beispielhaft eine "ideale" Wirkfläche.

$$y = b_0 + b_1A + b_2B + b_{11}A^2 + b_{22}B^2 + b_{12}A \times B \quad \text{Gleichung 1}$$

y bezeichnet z.B. die gemessene Renaturierungsausbeute, bei b_n handelt es sich um die zu bestimmenden Parameter zur Charakterisierung der Abhängigkeiten, A und B sind Konzentrationsstufen der Einflussfaktoren.

6.2.3 Proteinchemische Methoden

6.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese

Es wurden sowohl 10 %ige, 12,5 %ige als auch 15 %ige Gele zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet. Die Elektrophoresen erfolgten unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen nach Lämmli *et al.* 1970. Tab. 5 zeigt beispielhaft die Rezeptur für ein 12,5 %iges Gel.

Nach Aufbau der Gießapparatur wurden zuerst die Lösungen für die Trenngele zwischen die Glasplatten gegossen und mit 80 % Ethanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde der Ethanolüberstand vollständig entfernt und die Lösung für das Sammelgel eingefüllt. Zur Ausbildung der Geltaschen wurden vorwiegend 10er-Kämme verwendet. Die zu trennenden Proteine wurden mit sechsfach konzentriertem Probenpuffer (6 mg Bromphenol-

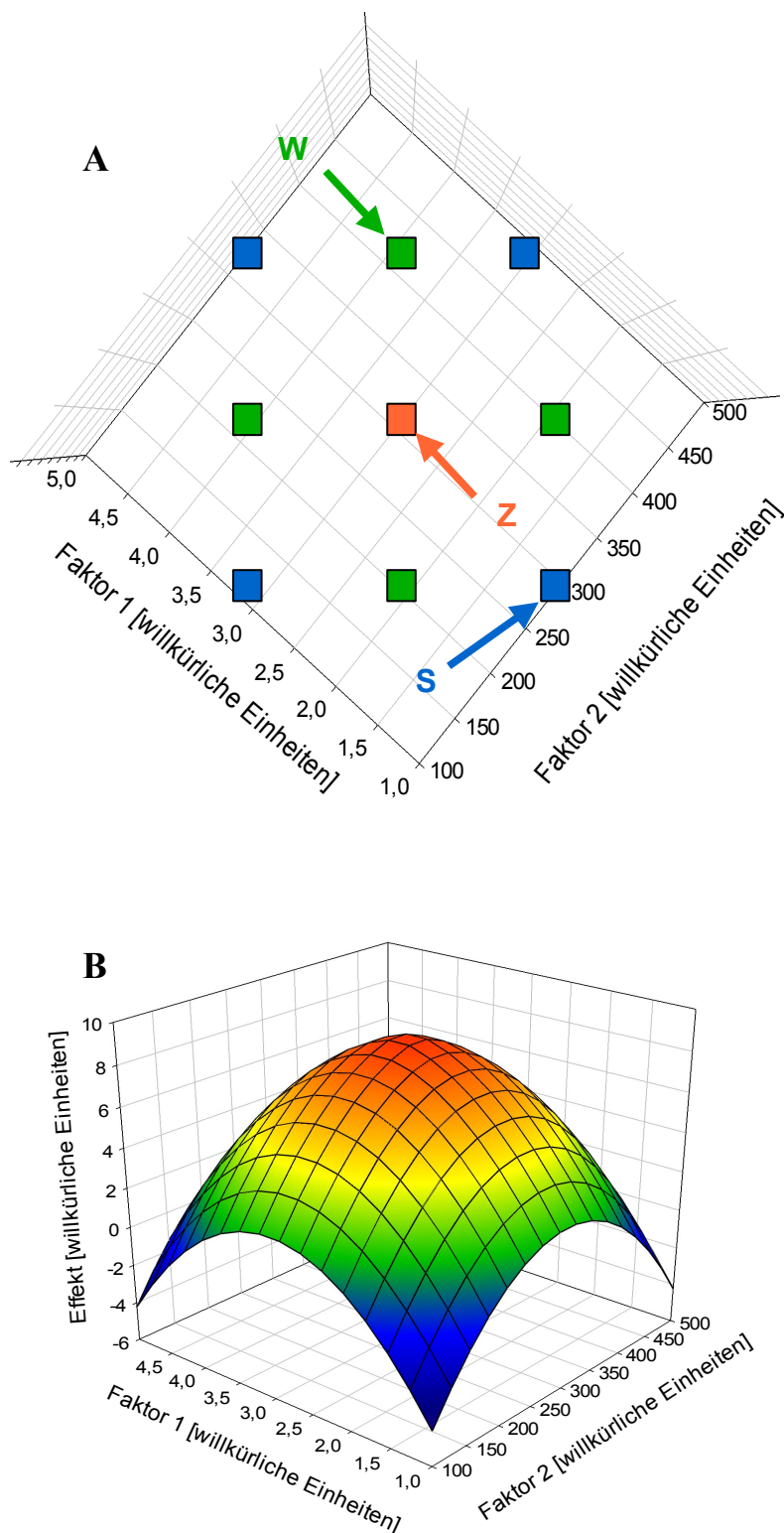


Abb. 5: Erstellung einer Wirkfläche für zwei fiktive Einflussfaktoren

Im Abbildungsteil A sind die Punkte dargestellt, die durch das Computerprogramm CADEMO (BioMath GmbH) als mindestens notwendige Werte, die eine Berechnung des Wirkungsoptimums ermöglichen, ermittelt wurden. Im Beispiel mit 2 Einflussfaktoren sind dies 9 Punkte: 1 Zentral- (Z), und je 4 Stern- (S) und Würfelpunkte (W). Abbildungsteil B zeigt eine fiktive Wirkfläche. Durch Vorversuche oder Literaturdaten muss das Konzentrationsoptimum der Einflussfaktoren ungefähr bekannt sein, damit sich eine allseitig abfallende Wirkfläche mit eindeutigem Maximum (orange dargestellt) ergibt.

blau; 1,5 ml 1 M TRIS-HCl pH 6,8; 2,5 ml 20 % SDS; 1 ml Glycerol; 0,55 ml β -Mercaptoethanol) versetzt und bei 95 °C 5 min lang denaturiert. Die Taschen wurden mit 2 bis maximal 25 μ l der Probe gefüllt. Für die Größenbestimmung der Proteine wurden die Marker See Blue® Plus 2 Pre-Stained Standard (Invitrogen), Bench Mark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen), Page Ruler™ Protein Ladder (Fermentas), Roti-Mark Standard (Roth) oder Pre-stained Standard Broad Range (Bio-Rad) verwendet. Zur Elektrophorese wurden die Gele bei 200 V über 45 bis 60 min im Laufpuffer (120 mM Glycin; 8 mM SDS; 25 mM TRIS pH 9,2) belassen.

Tab. 5: Rezeptur für das Trenn-und Sammelgel

Zutat	Trenngel 12,5 %	Sammelgel 4,5 %
Deionisiertes Wasser	3,1 ml	3,05 ml
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	4,2 ml	0,75 ml
TRIS/HCl 1,5 M, pH 8,8	2,5 ml	-
TRIS/HCl 0,5 M, pH 6,8	-	1,25 ml
10 % SDS	100 μ l	50 μ l
TEMED	5 μ l	2,5 μ l
Ammoniumpersulfat 10 %	100 μ l	50 μ l

Die Polyacrylamidgele wurden 20 bis 120 min in Coomassie-Färbelösung (0,75 g Coomassie-Blau G250; 50 ml Essigsäure; 200 ml Methanol; 250 ml H₂O) geschwenkt. Eine mehrstündige Entfärbung erfolgte im Anschluss unter Verwendung von Entfärber (10 % Essigsäure und 30 % Methanol in Wasser). Danach wurden die Gele mit Wasser gespült, in 10 % Ethanol gelegt und fotografiert (Image Master).

Zur Konzentrationsbestimmung einzelner Komponenten von Proteingemischen wurden von der Lösung mit unbekannter Proteinkonzentration meist drei unterschiedliche Volumina in der Polyacrylamidgelelektrophorese eingesetzt, zusammen mit vier Albuminstandards getrennt und wie beschrieben entwickelt. Das digitalisierte Foto wurde unter Verwendung des Programms Aida Image Analyzer 3.11 densitometrisch ausgewertet.

Zur langfristigen Aufbewahrung wurden ausgewählte Gele getrocknet (Gel Dryer, bei 60 °C ca. 20 min unter Vakuum zwischen Zellophan).

Zur Entfernung von GdnHCl, das zur Auflösung der bei der Expression gewonnenen Einschlusskörperchen notwendig war, wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt. Dazu wurden die Proben zunächst 1/10 mit eiskaltem 100 % Ethanol verdünnt und 5 bis 10 min bei -80 °C inkubiert. Nach Zentrifugation in der Eppendorf-Tischzentrifuge (5 min, 4 °C, max. Geschwindigkeit) wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 90 % eiskaltem Ethanol resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abpipettiert, das Pellet kurz getrocknet und dann in Elektrophorese- Probenpuffer aufgelöst.

6.2.3.2 Reinigung des Propeptides durch Gelchromatographie

Mittels einer HighLoad Superdex 75 16/60 Säule (Pharmacia Biotec) wurden 2 ml solubili-sierte Einschlusskörperchen (6 M GuaHCl; 50 mM NaAcetat pH 4.5) unter schwach denatu-rierenden Bedingungen (50 mM Natriumacetatpuffer pH 4.5 mit 0,5 M GdnHCl und 15 % Acetonitril) mit der Molekularsiebmethode gereinigt. Die Flussrate betrug 1,5 ml/min und das Eluat wurde in Fraktionen von je 2 ml gesammelt. Mittels UV-Spektrophotometrie bei 280 nm und 260 nm wurden Reinheit und Proteinkonzentration jeder Fraktion unter Ver-wendung des molaren Extinktionskoeffizienten abgeschätzt. Die Propeptid-haltigen Fraktio-nen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration mit einer YM10 Membran (Amicon) konzen-triert. Die Berechnung der exakten Proteinkonzentration erfolgte durch densitometrische Aus-wertung von Polyacrylamid-Gelelektrophoresen mit dem Programm AIDA. Als Standard diente humanes Serumalbumin (Serva).

6.2.3.3 Proteinidentifizierung durch MALDI-ToF

Die gereinigten Proben (ca. 10 µM Protein) wurden nach der Vorschrift des Herstellers (Milli-pore) mit ZipTip_{C18} entsalzt. Das mit 0,1 % Trifluoressigsäure/50 % Acetonitril eluierte Mate-rial wurde im Verhältnis 1/1 mit Sinapinsäurelösung (2 mg Sinapinsäure in 150 µl des o.g. Elutionsmediums) vermischt. 2 µl der Mischung wurden auf den Probenträger pipettiert und getrocknet (entspricht 5-10 pmol pro Position). Die Messungen erfolgten unter Verwendung von humanem Albumin oder Cytochrom c als Molekulargewichtsstandard im Linearbetrieb.

6.2.3.4 Renaturierung des Prokathepsin F

Die Optimierung der Renaturierung von bakteriell exprimiertem humanen Prokathepsin F ist ein wesentlicher Teil der Ergebnisse. Dabei wurde die Renaturierungsausbeute (Y_{\max}) grund-sätzlich aus dem Zeitverlauf der gemessenen Enzymaktivität (Y) entweder ohne oder nach he-

terokatalytischer Prozessierung (auch das Proenzym zeigte geringe proteolytische Aktivität) unter Verwendung der Gleichung 2 errechnet:

$$Y = Y_{max} \times (1 - e^{-k \times t}) \quad \text{Gleichung 2}$$

Die Geschwindigkeitskonstante der Renaturierung ist k, t bezeichnet die Renaturierungszeit.

Nach Abschluss der Optimierungsversuche hatte das Renaturierungsmedium folgende Zusammensetzung:

Zusatz	GSH	GSSG	Glyzerol	Arginin	HEPES pH 7.4	EDTA	NaN ₃
Konzentration	14 mM	2 mM	40 %	650 mM	500 mM	2 mM	0,02 %

Das zu Beginn der Experimente vollständig durch 6 M Guanidinhydrochlorid denaturierte Proenzym wurde im Verhältnis 1/66,67 mit dem Renaturierungsmedium verdünnt und 48 h bei 16 °C inkubiert.

6.2.3.5 Prozessierung des renaturierten Prokathesin F mit Pepsin

Die Pepsinbehandlung ist in der Literatur als eine Möglichkeit zur präparativen Prozessierung des Prokathesin F beschrieben worden (Wang *et al.* 1998, Fonovič *et al.* 2004); hier wurde sie im analytischen Maßstab genutzt, um die messbare Enzymaktivität zu erhöhen und damit die Nachweisgrenze zu senken. Das Verfahren wurde für das bakteriell hergestellte Enzym optimiert (siehe Ergebnisse), am Ende stand folgender Ablauf: Das Proenzym wurde vor der Messung der Enzymaktivität mindestens 1/10 und höchstens 1/20 mit dem optimierten Prozessierungsmedium (25 nM Pepsin / 100 mM Zitrat pH 3.5 / 2 mM EDTA / 2 mM DTT) verdünnt und bei Raumtemperatur 20 min lang inkubiert.

6.2.4 Aktivitätsbestimmungen des Proenzym sowie des reifen Katesin F

Die Aktivitätsbestimmung des renaturierten und gegebenenfalls prozessierten humanen Katesin F erfolgte durch fluorometrische Messungen der Abspaltung des Fluorophors 7-Amino-4-Methyl-Cumarin von N-geschützten Dipeptidsubstraten. Bei der Hydrolyse der Peptidbindung ändert sich die Elektronenkonfiguration des 7-Amino-4-Methyl-Cumarin, was zu anderen optischen Eigenschaften führt, die den spezifischen und hochempfindlichen Nachweis ermöglichen. Bei der praktischen Durchführung wurden fast immer Mikrotiterplatten benutzt,

da so bis zu 96 Proben auf einmal analysiert werden konnten. Es wurden sowohl Platten mit V-Wells (220 μl Gesamtvolumen) als auch F-Wells (350 μl Gesamtvolumen) verwendet, wobei bei gleicher Signalhöhe bei Verwendung von V-Well-Platten eine Materialeinsparung von etwa 33 % möglich ist. Der Nachteil dieses Plattentyps ist die Begrenzung auf Mischungsverhältnisse kleiner 1/100; denn um den Dosierfehler gering zu halten, wurden nie kleinere Volumina als 2 μl pipettiert. Das Fluorometer Spectra Max Gemini hat eine eingebaute Heizung, die jedoch nie benutzt wurde, da aus entsprechenden Vorversuchen bekannt war, dass im aufgeheizten Messgerät bei längeren Messzeiten Flüssigkeit verdunstet und die Temperatureinstellung in den Proben nur langsam erfolgt. Beides hätte zu Nichtlinearitäten der kinetischen Messung, die meist 20 bis 30 min dauerte, geführt. So war der Kurvenverlauf linear und der Anstieg konnte einfach durch die geräteinterne Software ermittelt werden. Er war proportional zur Bildung des Produktes 7-Amino-4-Methyl-Cumarin und damit zur Enzymaktivität. Um die Geräte-spezifischen Fluoreszenzeinheiten in Molaritäten umrechnen zu können, wurde eine Eichung mit dem Produkt 7-Amino-4-Methyl-Cumarin durchgeführt. Gearbeitet wurde mit einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 440 nm. Ein Sperrfilter bei 420 nm verbesserte das Signal-Rausch-Verhältnis. Das Testmedium hatte folgende Zusammensetzung:

Zusatz	Zitratpuffer pH 6.0	Substrat	EDTA	DTT	DMSO
Konzentration	100 mM	20 μM	2 mM	2 mM	1 vol %

Als Substrate wurden Z-Phe-Arg-AMC und Z-Leu-Arg-AMC verwendet.

6.2.5 K_M -Wert-Bestimmung des Prokathepsin F

Durch Messung der Enzymaktivität am Fluorometer Spectra Max Gemini als Funktion der Substratkonzentration im Bereich von 5-100 μM wurde sowohl für Z-Phe-Arg-AMC als auch für Z-Leu-Arg-AMC der K_M -Wert ermittelt. Die Konzentration an DMSO betrug dabei maximal 1 % (Zusammensetzung des Testmediums ansonsten wie unter 6.2.4 beschrieben). Die Produktbildungskurven wurden registriert, jeweils die anfängliche Enzymaktivität ermittelt und in Abhängigkeit von der Substratkonzentration dargestellt. Die Auswertung erfolgte mittels nichtlinearer Regression unter Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 3).

$$v_z = \frac{V_{max} \cdot S_0}{K_M + S_0} \quad \text{Gleichung 3}$$

V_{max} bezeichnet die Maximalgeschwindigkeit, v_z die beobachtete Anfangsgeschwindigkeit des Enzyms, S_0 die Substratkonzentration zu Beginn der Reaktion und K_M die Michaelis-Menten-Konstante.

6.2.6 E64- Titration

E64 ist ein hochaffiner Inhibitor von Cysteinproteasen, der in einer langsamen Reaktion mit dem katalytischen Cysteinylrest einen stabilen 1:1-Komplex bildet. Für diese Enzyme ist deshalb die Titration mit E64 Mittel der Wahl zur Bestimmung der Konzentration an katalytisch wirksamem Enzym. Dazu wird üblicherweise das Enzym in jeweils gleicher Konzentration mit E64 in unterschiedlichen Konzentrationen versetzt, bis zu einer Stunde inkubiert und dann durch Zusatz von Substrat haltigem Testpuffer die Restaktivität bestimmt. Diese Methode funktionierte im vorliegenden Fall nicht; die Aktivität des Enzyms kehrte nach der Verdünnung mit Testpuffer rasch wieder.

Deshalb wurde ohne Vorinkubation gearbeitet: In acht Wells einer F-MTP wurde Testmedium mit 18 μM Z-Phe-Arg-AMC und 0–210 nM E64 pipettiert und vermischt. Anschließend wurden 2,5 μl Enzymlösung dazugegeben. Es wurde 1 min geschüttelt und danach 30 min lang gemessen. Unter diesen Bedingungen kam es zu einem annähernd linearen Abfall der gemessenen Enzymaktivität mit zunehmender E64-Konzentration, so dass die totale Enzymkonzentration aus dem Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Abszisse errechnet werden konnte.

6.2.7 Inhibition von Kathepsinen durch das Kathepsin F-Propeptid

Die Bestimmung der Hemmwirkung erfolgte im fluorometrischen Test, ähnlich wie bei der Aktivitätsbestimmung des Kathepsin F beschrieben, durch einen Vergleich der Produktbildungsrate ohne und mit potentiellen Inhibitor, d.h. dem Propeptid. Die Messungen erfolgten in Mikrotiterplatten (F-Wells, 350 μl Fassungsvermögen) am Fluorometer Spectra Max Gemini. Die eingesetzten Propeptid-Konzentrationen lagen zwischen 57 nM und 3,2 μM . Die Testbedingungen entsprachen beim Kathepsin F den Standardbedingungen und bei den übrigen Enzymen den in der eigenen Arbeitsgruppe gefundenen optimalen Testbedingungen für das jeweils untersuchte Kathepsin (Tab. 6).

Tab. 6: Testbedingungen für die Inhibitionsstudien mit dem Kathepsin F-Propeptid

	Kathepsin H	Kathepsin L	Kathepsin S	Kathepsin F
Enzymkonzentration	3,21 U/μl	15,24 nM	13,57 nM	64 nM
Substrat	H-Arg-AMC	Z-Phe-Arg-AMC	Z-Val-Val-Arg-AMC	Z-Phe-Arg-AMC
Substratkonzentration im Test	20 μM	5 μM	40 μM	20 μM
jeweils gelöst in 1 % DMSO				
Zusammensetzung der Testpuffer				
Puffersubstanz	125 mM Na ⁺ -K ⁺ -Phosphat pH 6.1	125 mM Na ⁺ -K ⁺ -Phosphat pH 6.1	50 mM K ⁺ -Phosphat pH 6.5	Na ⁺ -Zitrat 100 mM pH 6.0
EDTA	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
DTT	5 mM	2 mM	2 mM	2 mM
Triton X 100	0.01 %	0.01 %	0.01 %	
NaCl			50 mM	

Während der Beobachtungszeit (15 bis max. 60 min) war der Substratverbrauch zwar gering, trotzdem ergaben sich nichtlineare Produktbildungs (P)-Zeit-Verläufe, aus denen unter Verwendung von

$$P = P_0 + v_0 \times t \times e^{-b \times t} \quad \text{Gleichung 4}$$

grundsätzlich die Anfangsgeschwindigkeit (v_0) berechnet wurde. Aus der Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeiten von der Propeptidkonzentration ($[I]$) wurde unter Verwendung des Michaelis-Menten-Modells für kompetitive Inhibition

$$v = V_{\max} \times [S] / K_M / (1 + [S]/K_M + [I]/K_i) \quad \text{Gleichung 5}$$

die Inhibitionskonstante (K_i) berechnet.

7. ERGEBNISSE

7.1 Expression und Charakterisierung von Teilsequenzen des humanen Prokathepsin F

7.1.1 Expression in *E. coli*

Wie bereits in der Einleitung beschrieben wurde, unterscheidet sich Prokathepsin F sowohl durch seine ungewöhnlich lange Proregion als auch durch das Vorhandensein einer Cystatin-ähnlichen Domäne innerhalb dieser Proregion von anderen bekannten humanen Cysteinproteasen. Die Funktion dieser Cystatin-ähnlichen Domäne ist zur Zeit unbekannt. Bisher ist es noch keiner Arbeitsgruppe gelungen, das vollständige Prokathepsin F gentechnisch herzustellen; lediglich eine verkürzte Form ohne Cystatin-ähnliche Domäne wurde beschrieben (Fonovič *et al.* 2004). Dieses verkürzte Prokathepsin F sollte von mir zu Vergleichszwecken ebenfalls in *E. coli* hergestellt werden; darüber hinaus aber auch die vollständige Sequenz des Prokathepsin F, das komplette Propeptid und das Propeptid ohne Cystatin-ähnliche Domäne. In Abb. 6 sind diese vier rekombinanten Proteine skizziert und durch einige Eckdaten charakterisiert.

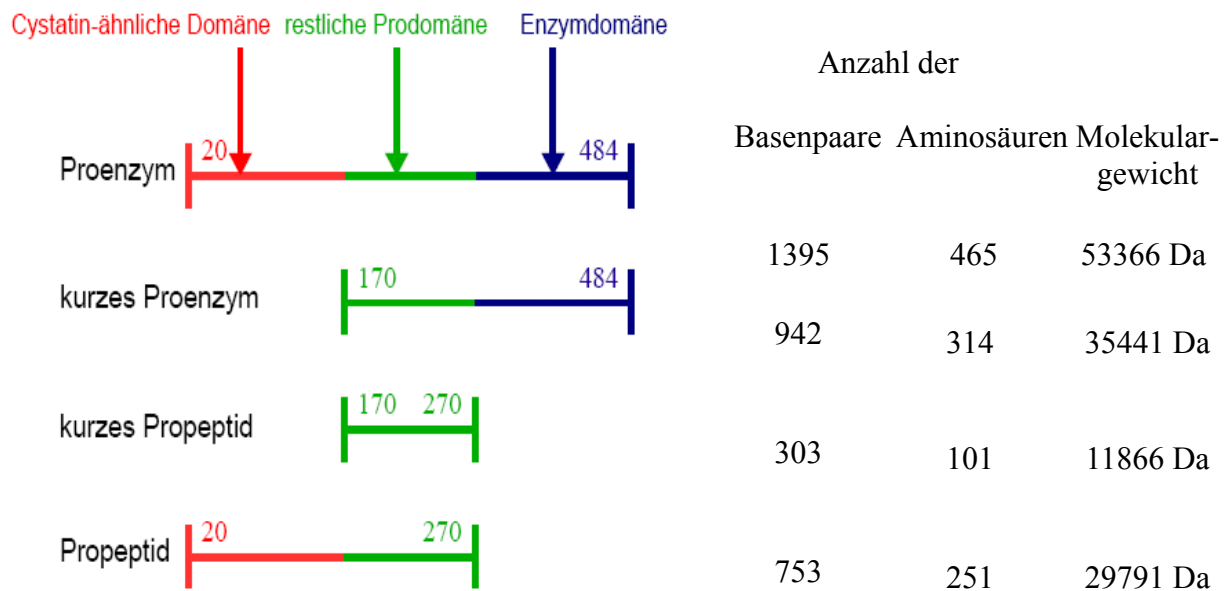


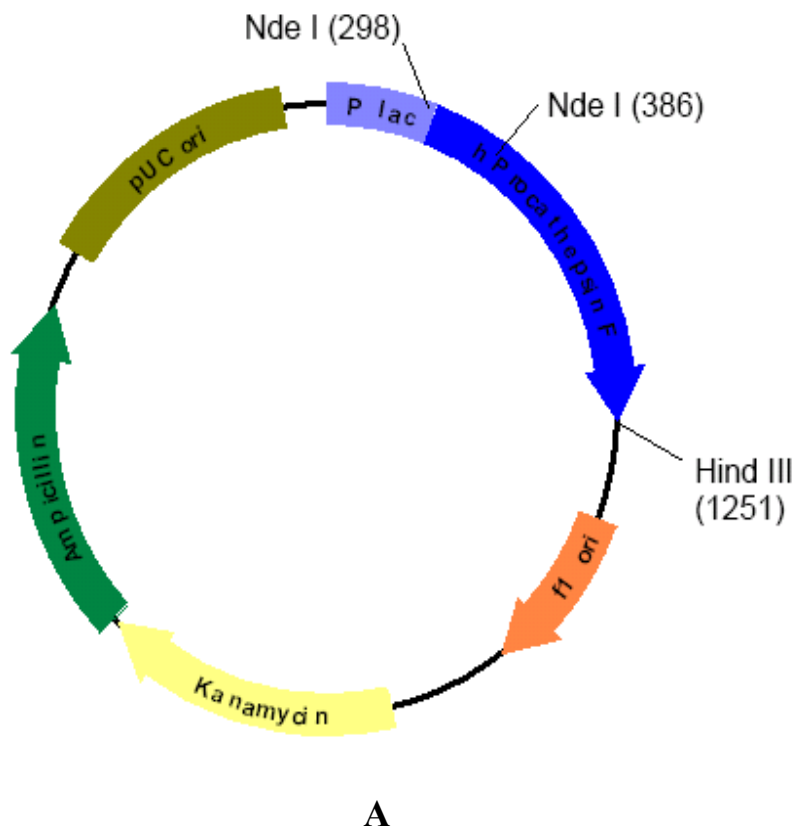
Abb. 6: Geplante Expressionsprodukte des humanen Prokathepsin F

Über den Balken sind jeweils die Aminosäurepositionen angegeben. Diese Nummerierung basiert auf der SwissProtDatenbank und berücksichtigt auch die Signalsequenz, welche die Aminosäuren 1–19 umfasst.

Ausgehend von der cDNA-Matrize für das vollständige Prä-Prokathepsin F wurden mittels PCR unter Verwendung der in Tab. 2 aufgelisteten Primer die gewünschten Teilsequenzen amplifiziert. Die Wahl der Primer erfolgte für die jeweils kürzere Version des Prokathepsin F und des Propeptids so, dass deren N-Terminus mit der Form übereinstimmt, die nach Expression des vollständigen Prokathepsin F im Baculovirussystem während der anschließenden Reinigung spontan, wahrscheinlich unter der Einwirkung der viralen V-cath-Protease, entstanden war (Fonovič *et al.* 2004). Nach Anfügen von dA-Überhängen wurden die PCR-Produkte als Insert in den Vektor pCR2.1-TOPO eingefügt, der dann zur Transformation von *E. coli*-TOP10-Bakterien diente. Durch Blau/Weiß-Selektion wurden die positiven Klone erkannt und anschließend deren Inserts in den Vektor pRSET-B umkloniert. Zur Kontrolle der korrekten Amplifikation, Transformation und Ligation wurden die Inserts beider Vektoren sequenziert. Zuletzt wurde der Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformiert und die Überexpression der gewünschten Proteine mit 1 mM IPTG induziert. Abb. 7 zeigt die dazu verwendeten Vektoren.

Nach diesem Verfahren wurden das Propeptid ohne Cystatin-ähnliche Domäne sowie das verkürzte Proenzym erfolgreich exprimiert. Sie befanden sich jeweils im unlöslichen Zellprotein, das hauptsächlich Einschlusskörperchen enthält. Das konnte in Coomassie-gefärbten SDS-Gelen nachgewiesen werden (Abb. 8). Im Teil A ist ein Foto des Geles für das kurze Propeptid zu sehen, welches eine Größe von 11,9 kDa hat. Eine entsprechende Bande, deren Intensität nach Induktion zunimmt, ist sichtbar (siehe grüner Pfeil). Das verkürzte Proenzym hat ein errechnetes Molekulargewicht von 35,4 kDa. Im Foto B ist ebenfalls eine Bande zu sehen, die mit der Zeit zunimmt, jedoch gemessen an den Markerproteinen ein geringfügig höheres Molekulargewicht als 36 kDa hat (siehe blauer Pfeil im Abbildungsteil B). Die Identität beider Proteine konnte später mittels MALDI und N-terminaler Sequenzierung zweifelsfrei nachgewiesen werden. Es wurden auch die löslichen Zellproteine und das Medium untersucht (ohne Abbildung), aber dort kam es nach der Induktion zu keiner Intensitätszunahme einer Bande im relevanten Molekulargewichtsbereich.

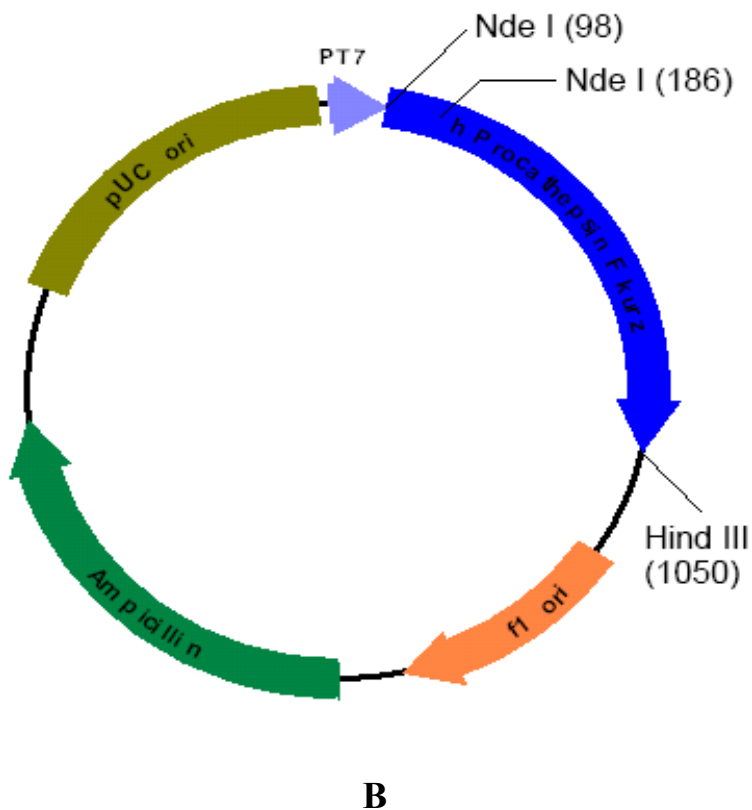
Es gelang allerdings nicht, alle vier geplanten Teilsequenzen erfolgreich zu exprimieren. Die beiden Bakterienkulturen, die mit den Vektoren transformiert worden waren, die die genetische Information für die Cystatin-ähnliche Domäne einschlossen, reagierten nicht auf den Induktor. Wegen der Bedeutung gerade dieser Wildtyp-Proteine für die Zielstellung der Arbeit wurden erhebliche Bemühungen unternommen, um doch noch zum Erfolg zu kommen.



**Abb. 7: Illustration
verwendeter Vektoren**

Die Zahlen bezeichnen die Basenposition der Schnittstelle der Restriktionsenzyme bezogen auf den Promotor. Es wurden jeweils die Ampicillinresistenzen und die Restriktionsschnittstellen (bei Nde I nur an den Positionen 298 bzw. 98) genutzt.

Der im Teil A dargestellte Vektor pCR2.1-TOPO wurde erfolgreich zur Klonierung aller vier Kathepsin-F-Sequenzen verwendet (hier nur abgebildet für das kurze Proenzym). Das lac-Gen diente der Blau/Weiß-Selektion.



Auch der Expressionsvektor pRSET-B (Abbildungsteil B) wurde für alle Sequenzen genutzt. Der hellblaue Pfeil (PT7) bezeichnet den mit IPTG induzierbaren T7-Promotor.

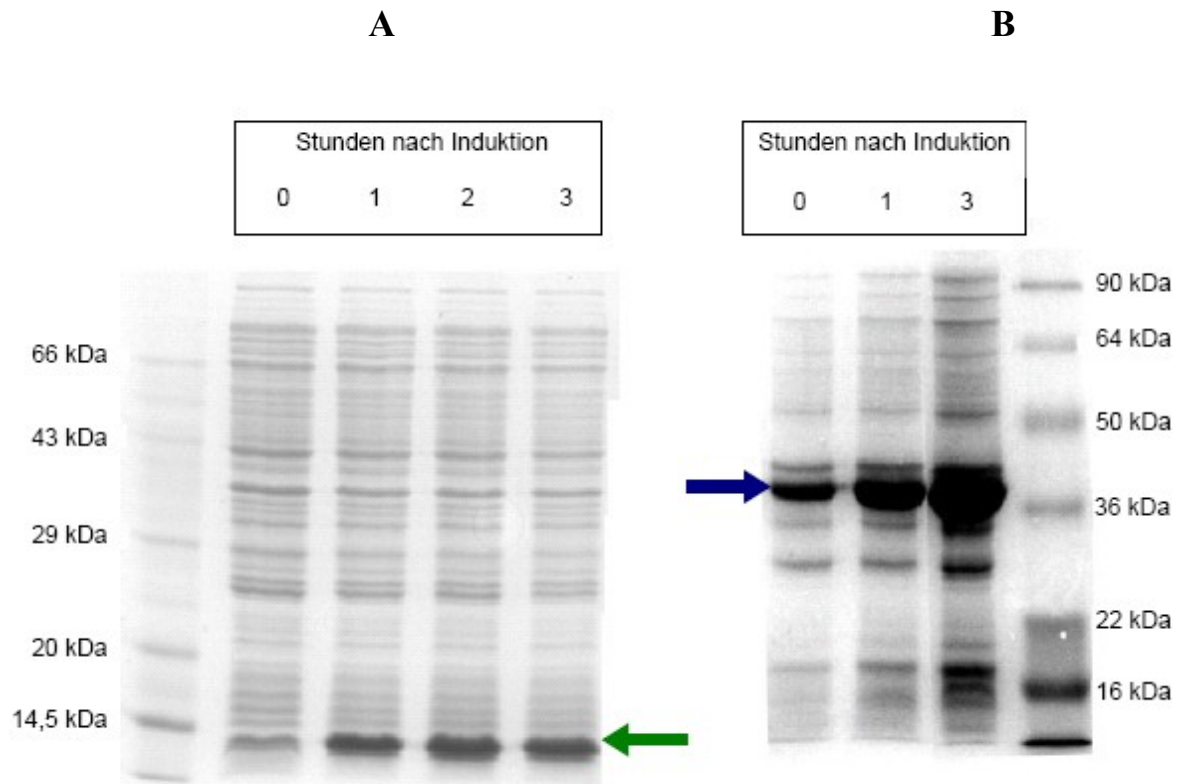


Abb. 8: Expressionskontrollen des Propeptides (AS 170 - 270, Teil A) und des Proenzym (AS 170 - 484, Teil B)

Nach Induktion mit 1 mM IPTG wurden in stündlichen Abständen Proben entnommen, die, wie in der Methodik (siehe 6.2.1.6) beschrieben, durch Zentrifugation in 3 Fraktionen getrennt und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert wurden. Hier ist nur die Auftrennung der unlöslichen Zellproteinfraktion zum Zeitpunkt der Induktion und bis zu drei Stunden danach zu sehen.

Nahe liegend war erst einmal die mehrfache Wiederholung des beschriebenen Vorgehens, um Zufälligkeiten auszuschließen. Als so nie ein positives Ergebnis erzielt werden konnte, wurde zum *E. coli* - Expressionsstamm BL21 (DE3) pLysS Rosetta gewechselt. Er zeichnet sich dadurch aus, dass er die sonst nur in geringer Konzentration vorhandenen tRNAs für den Einbau der Aminosäuren Arg, Ile, Gly, Leu und Pro verstärkt produzieren kann. Das so genannte Codon-Usage-Problem, welches das Missverhältnis von tRNAs im Zytosol von *E. coli* und dem häufigeren Vorkommen entsprechender Triplets bei der RNA der rekombinanten Proteine bezeichnet, kann Ursache für das Misslingen von heterologen Expressionsversuchen sein und sollte durch Verwendung dieses Stammes ausgeschlossen werden. Auch über eine Expression in *P. pastoris* wurde nachgedacht. Für die Entscheidung wurden die tRNA-Übereinstimmungen für beide Organismen unter Verwendung des Graph Codon Usage Analyser untersucht.

Bei beiden Wirtsorganismen ist insbesondere für die Cystatin-ähnliche Domäne des Prokathepsin F die prozentuale Übereinstimmung bei den seltenen tRNAs problematisch. *P. pastoris* wäre für eine erfolgreiche Expression dieses Molekülabschnittes theoretisch auch nicht besser geeignet gewesen, denn hier ist der Wert für weniger als 20 % Übereinstimmung besonders hoch (siehe Tab. 7). Das könnte der Grund dafür sein, dass in der Praxis die Expression der vollständigen Prokathepsin-F-Sequenz in Hefe sowohl Wang als auch Somoza und deren Mitarbeitern misslang (Wang *et al.* 1998, Somoza *et al.* 2002). Aus diesen Gründen habe ich diesbezüglich von weiteren Expressionsversuchen abgesehen.

Tab. 7: Untersuchung des Codon-Usage-Problems für das humane Kathepsin F

Kathepsin-F-Abschnitt	<i>Pichia pastoris</i>			<i>Escherichia coli</i>		
	prozentuale Konzentrationen	Häufigkeit im Vergleich zu humanen Zellen	der Übereinstimmungen	der tRNA-Konzentrationen	der tRNA-Konzentrationen	der tRNA-Konzentrationen
	>30 %	<20 %	< 30 % und >20 %	>30 %	<20 %	<30 % und >20 %
Cystatin-ähnliche Domäne	86,57	8,61	4,64	80,79	4,64	14,57
restliche Prodomäne	91,09	3,96	4,95	83,17	4,95	11,88
Enzymdomäne	91,16	3,26	5,58	86,98	1,4	11,63

Da mir für die weiteren Experimente also nicht alle vier Teilsequenzen (siehe Abb. 6), sondern nur jeweils die verkürzten Formen des Propeptids bzw. des Proenzym zur Verfügung standen, wird diese Tatsache nachfolgend nur noch dann erwähnt, wenn es unbedingt notwendig ist, um Verwechslungen auszuschließen.

7.1.2 Charakterisierung der exprimierten Konstrukte mittels MALDI-ToF

Identität und Reinheit der Expressionsprodukte wurden mittels MALDI-ToF überprüft. Die Abb. 9 zeigt die Ergebnisse.

Beim Propeptid (Abb. 9 Teil A) ist ein Gipfel bei 11874 Da zu erkennen (das errechnete Molekulargewicht entspricht 11866 Da). Die Analyse des Proenzym ergab einen Gipfel bei 35435 Da (Abb. 9 Teil B). Dieser entspricht genau dem Molekulargewicht des Prokathepsin F.

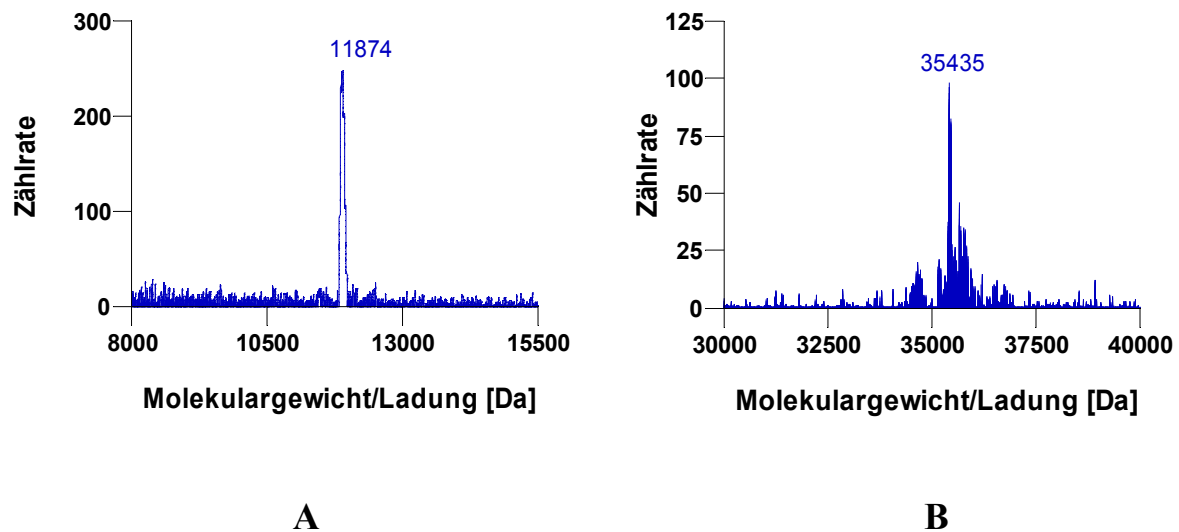


Abb. 9: MALDI-ToF-Analyse des kurzen Propeptides (Teil A) und des kurzen Prokathepsin F (Teil B)

Die Proben wurden jeweils wie unter 6.2.3.3 beschrieben vorbereitet. Als Eichprotein wurden Cytochrom c (A) bzw. humanes Albumin (B) verwendet. Die Analyse erfolgte freundlicherweise durch Frau Endmann (ehemalige Mitarbeiterin im eigenen Institut).

7.1.3 Charakterisierung der rekombinaten Proteine durch N-terminale Sequenzierung

Bei der Analyse des N-Terminus konnten für das Propeptid die ersten 9 (MLNEDPLLQ), für das Proenzym die ersten 10 Aminosäuren (MLNEDPLSQD) sicher bestimmt werden. Das entspricht in beiden Fällen genau der Datenbanksequenz (MLNEDPLSQD), die exprimierten Proteine entsprechen also auch diesbezüglich den Erwartungen. Beide Sequenzierungen erfolgten in der Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Schlott (IMB).

7.2 Reinigung und Charakterisierung des Propeptides

Die Einschußkörperchen mit dem rekombinanten Propeptid wurden in 6 M Guanidinhydrochlorid gelöst. Die Lösung wurde, wie in der Methodik ausführlich beschrieben, auf eine Gelchromatographie-Säule mit einer Ausschlußgrenze von 75 kD aufgetragen und mit einer Flussrate von 1,5 ml/min getrennt. Abb. 10 zeigt das Elutionsprofil.

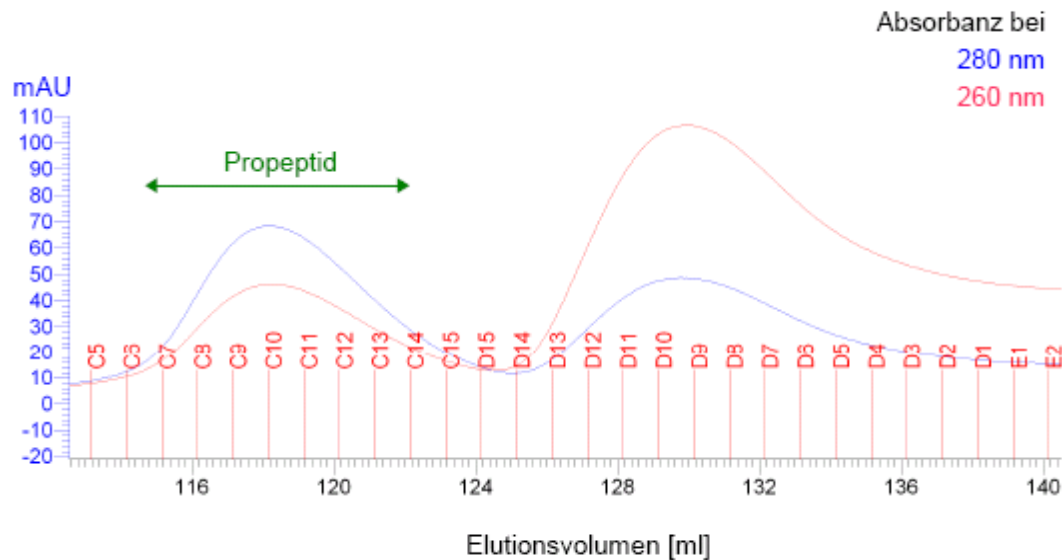


Abb. 10: Chromatographie des kurzen Propeptides

Die durch Solubilisierung mittels 6 M Guanidin-HCl aus den Einschlusskörperchen gelösten Proteine wurden über eine HighLoad Superdex 75 16/60 Säule (Pharmacia Biotec) unter schwach denaturierenden Bedingungen getrennt. Dargestellt sind die mittels Durchflussszelle registrierten Absorbanzen bei 260 und 280 nm im Eluat als Funktion des Elutionsvolumens. Rot eingezeichnet sind jeweils die Nummern der Fraktionen (von C5 bis E2). Aufgetragen wurden 3 ml solubilierte Einschlusskörperchen, das Fraktionsvolumen betrug 1 ml.

Das Propeptid befand sich in den Fraktionen C7 bis C14 (in Abb. 10 grün markiert). Das ergab ein Vergleich der Absorbanzspektren im langwelligen UV-Bereich (250 bis 310 nm) aller Fraktionen. Nur bei den Fraktionen C7 bis C14 war der Gipfel bei 280 nm höher als bei 260 nm, wie das für ein Protein zu erwarten ist. In den Fraktionen D14 bis D4 (sie entsprechen etwa dem Säulengesamtvolumen) befand sich eine niedermolekulare Verunreinigung, deren Natur nicht weiter untersucht wurde.

Die Protein enthaltenen Fraktionen wurden im Chromatographiemedium mit 0,5 M Guanidinhydrochlorid belassen, vereinigt und mittels Ultrafiltration (YM 10) ca. 6-fach konzentriert. Dabei kam es zur Präzipitation, was eine spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten unmöglich machte. Die Präzipitate wurden deshalb mit Chromatographiemedium resolubilisiert, die Proteine durch eine Ethanolfällung konzentriert und anschließend zusammen mit Albuminstandards elektrophore-

tisch getrennt und nach der Anfärbung densitometrisch untersucht. Zum Vergleich wurde auch das ungereinigte Propeptid mit untersucht. Abb. 11 zeigt die Ergebnisse.

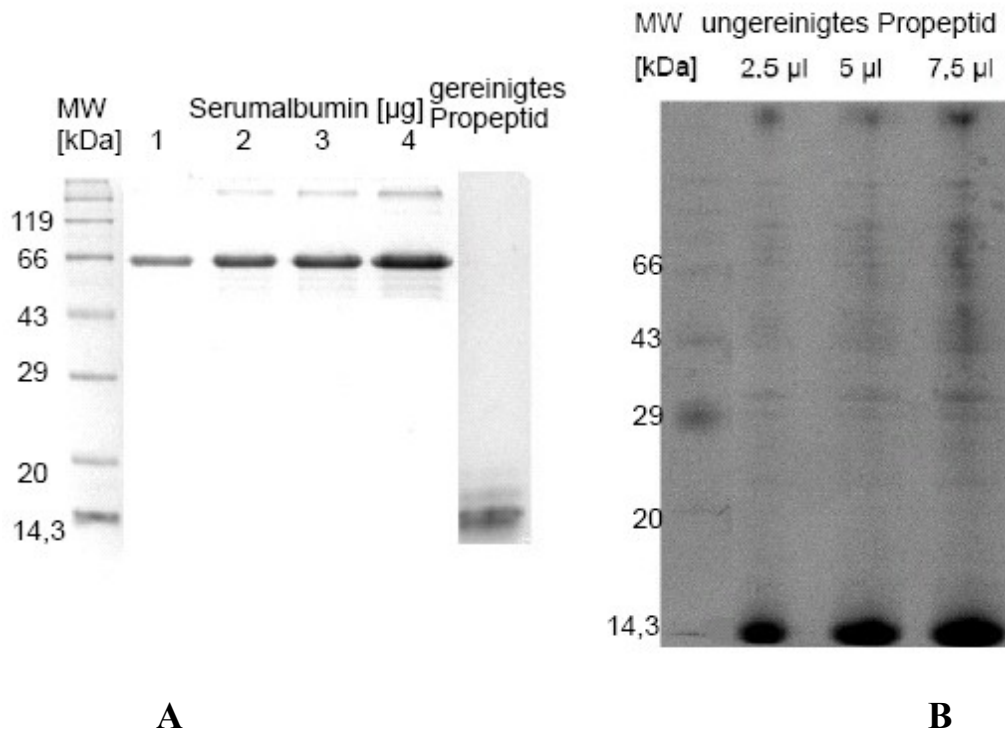


Abb. 11: Elektrophoresen zur Konzentrationsberechnung des Propeptides

Die Propeptidproben wurden zunächst durch Ethanolfällung von GdnHCl befreit. Die Elektrophoresen erfolgten im 12,5 %-igen Polyacrylamid-Gel unter Verwendung von humanem Serumalbumin als Standard (siehe Methodenteil 6.2.3.1). Die Abbildungen zeigen eines von drei Fotos, die jeweils separat mit dem Programm Aida (Version 3.11) densitometrisch ausgewertet wurden.

Teil A: Hier wurden 15 µl des mittels Säulenchromatographie gereinigten Propeptides aufgetragen.

Teil B: Hier wurde das Propeptid vor der Reinigung getrennt. Auch in diesem Experiment wurden 1-4 µg Serumalbumin als Vergleichswerte zur densitometrischen Konzentrationsbestimmung im selben Gel mit aufgetragen (die entsprechenden Banden sind nicht mit abgebildet).

Die densitometrische Analyse des ungereinigten Propeptids ergab eine Reinheit von 88 % und eine Proteinkonzentration der Stammlösung von 655 mg/ml. Unter Berücksichtigung der A_{280} von ca. 0,1 AU entspricht das 55,2 µM Propeptid. Nach der Reinigung betrug die Reinheit 93 % und die Proteinkonzentration lag bei zwei unabhängigen Auswertungen des gleichen Gels bei 96 bzw. 144 µg/ml (8,1 bis 12,1 µM Propeptid). Gerechnet wurde anschließend mit 10 µM.

Auch das gereinigte Propeptid wurde mittels MADLI untersucht. Abb. 12 zeigt das überraschende Ergebnis.

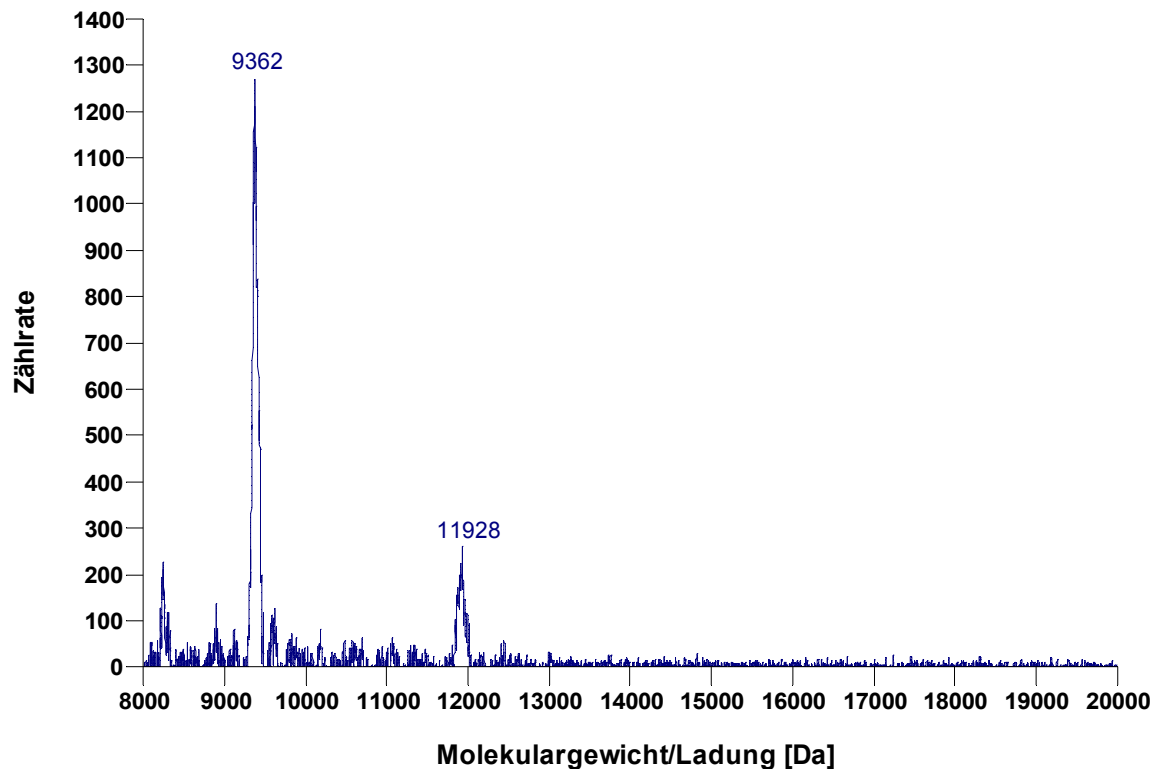


Abb. 12: MALDI-TOF des Propeptides nach der Reinigung

Die Proben wurden jeweils wie unter 6.2.3.3 beschrieben vorbereitet. Als Eichprotein wurde Cytochrom c verwendet.

Nach der Reinigung bleibt von dem Material vor der Reinigung (vergl. Abb. 9) nur noch ein Rest zurück und man findet zusätzlich ein Abbauprodukt des Propeptides mit einem Molekulargewicht von 9362 Da. Das Propeptid wurde also bei der Reinigung größtenteils zerstört. Der Versuch wurde im Abstand von mehreren Monaten mit einer anderen Säule mit gleichen Trenneigenschaften mit dem gleichen Ergebnis wiederholt, so dass eine Verunreinigung der Säule durch Proteasen als Ursache sehr unwahrscheinlich ist. Da die Propeptidpräparation auch vor der Säulenpassage schon eine akzeptable Reinheit hatte (vergl. Abb. 11 B), wurde den Ursachen dieser Zerstörung nicht weiter nachgegangen und auf den Chromatographieschritt verzichtet.

Aus eigenen Versuchen mit den Propeptiden anderer Kathepsine (Maubach *et. al.* 1997, Pietschmann 2002), die ähnlich hergestellt worden waren, war bekannt, dass sie nach der Überführung in ein physiologisches Medium spontan die korrekte Sekundär- und Tertiärstruktur ausbilden. Für das Kathepsin-F-Propeptid wurde ein analoges Verhalten angenommen,

was sich durch die erfolgreiche Inhibitionsstudien mit dem Kathepsin L auch bestätigte (vergl. Abb. 22). Folglich war keine spezieller Renaturierungsschritt notwendig.

7.3 Renaturierung, Prozessierung und enzymologische Charakterisierung des Prokathepsin F

In der eigenen Arbeitsgruppe waren schon zwei menschliche Enzyme der Papainfamilie erfolgreich durch heterologe Expression hergestellt worden (Paul 2006, Kramer 2007, Kramer *et al.* 2007); die dabei gemachten Erfahrungen waren der Ausgangspunkt meiner Arbeit. Die Überexpression in *E. coli* führte auch beim humanen Prokathepsin F zu dessen Präzipitation in Einschlusskörperchen. Diese mussten aufgelöst und das enthaltene Proenzym zur korrekten, biologisch aktiven Konformation renaturiert werden. Die Prüfung des Renaturierungserfolges erfolgte durch Messung der enzymatischen Aktivität, wobei die Substratspezifität des Enzyms aus der Literatur bekannt war, ebenso wie die Tatsache, dass sich die Aktivität durch Entfernung der Proregion mittels limitierter Proteolyse steigern lässt (Brömme *et al.* 2004). Die Optimierung der Renaturierung und die Versuche zur Pepsinprozessierung erfolgten nicht nacheinander, wie das die nachfolgende Darstellung in zwei separaten Abschnitten vermuten lassen könnte, sondern etwa zeitgleich. Um die Nachweisgrenze der Aktivitätsbestimmung zu steigern, wurde auch die kleinste erfolgreich renaturierte Charge zu Prozessierungsversuchen verwendet. Die dabei gewonnenen Erfahrungen flossen in die nachfolgenden Versuche ein.

7.3.1 Renaturierung des Prokathepsin F

Prinzipielle Einflussfaktoren, die es zu untersuchen und zu optimieren galt, waren die Renaturierungsdauer und -temperatur, der pH des Renaturierungsmediums und seine Zusätze, die Vorbehandlung des Materials mit denaturierenden Agenzien und das Verdünnungsverhältnis. Die nachfolgenden Graphiken und die Tabelle sind zusammenfassende Darstellungen, die nichts mit dem chronologischen Ablauf meiner experimentellen Arbeit zu tun haben. Sie basieren auf insgesamt ca. 35 Experimenten, deren prinzipieller Ablauf immer gleich war und in der Legende zur Abb. 13 beschrieben ist.

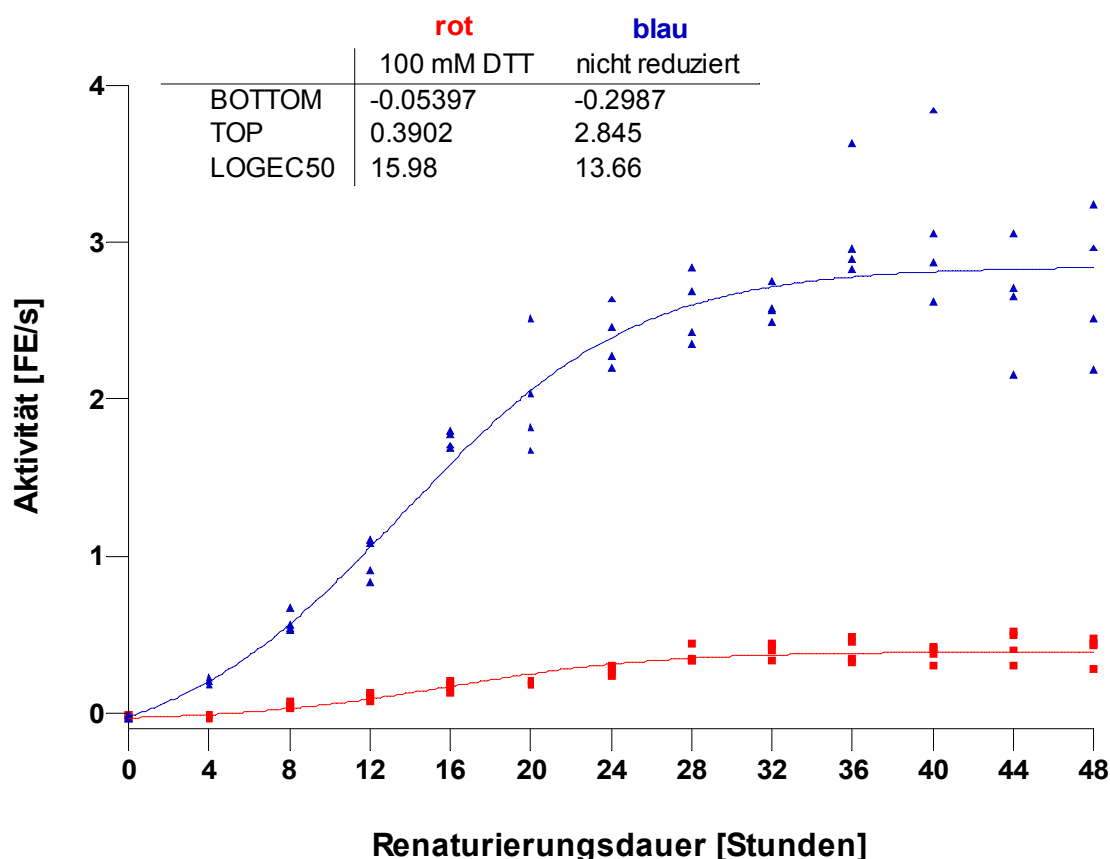


Abb. 13: Einfluss der Zeit und des Reduktionszustandes der Cysteinreste auf die Prokathesin-F-Renaturierungsausbeute

Prokathesin F wurde 1/66,67 mit dem Renaturierungsmedium verdünnt; die Zusammensetzung entsprach den optimierten Bedingungen (Hepespuffer 500 mM; GSH 14 mM; GSSG 2 mM; Glycerol 40 %; Arginin 650 mM; EDTA 2 mM; 0.02 % NaN₃; pH 7.4). Im rot dargestellten Versuchsteil wurde dem Denaturierungsmedium (6 M Guanidinhydrochlorid in 50 mM Natriumacetatpuffer pH 4.5) noch 100 mM DTT zur vollständigen Reduktion aller Disulfidbrücken (Inkubation \geq 45 min bei Raumtemperatur) zugesetzt. Im Abstand von 4 Stunden wurden dem Renaturierungsansatz Aliquots entnommen und bei -80 °C aufbewahrt. Die Vierfach-Bestimmungen wurden zum Ausschluss systematischer Fehler alternierend auf zwei MTPs verteilt. Anschließend wurden alle Proben gemeinsam prozessiert und nach Zugabe des Testmediums die Aktivität bestimmt (siehe Methodenteil 6.2.3.5 und 6.2.4). Die eingezeichneten Kurven wurden mit der Gleichung für einen sigmoidalen Dosis-Wirkungs-zusammenhang berechnet:

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LOGEC50} - X) \times \text{HillSlope}))} \quad \text{Gleichung 6}$$

BOTTOM bezeichnet den Ausgangswert, Top-Bottom die maximale Renaturierungsausbeute, LOGEC50 50 % der maximalen Renaturierungsausbeute und HillSlope den Anstieg der Kurve.

7.3.1.1 Renaturierungsdauer

Der Vorgang der Renaturierung ist prinzipiell langsam; meine Experimente schlossen den Bereich von 30 Minuten bis 92 Stunden ein. Abb. 13 zeigt das Ergebnis eines Experimentes mit 48-stündiger Beobachtungszeit. Die maximale Renaturierungsausbeute war schon nach ca. 30 Stunden erreicht. Die genaue Berechnung ergab für die beiden Kurven eine Zeit bis zum Erreichen von 50 % des Maximalwertes der Ausbeute von 14 und 16 Stunden. Unter Berücksichtigung dieses Ergebnisses wurden bei weiteren Experimenten etwa 40 Stunden lang beobachtet.

7.3.1.2 Vorbehandlung mit DTT

Die Abb. 13 zeigt nicht nur den Zeitverlauf, sondern auch noch den Einfluss einer Vorbehandlung des mit 6 M GdnHCl denaturierten Prokathepsin F mit 100 mM DTT. Eine solch hohe DTT-Konzentration führt innerhalb von 1 bis 2 h zur vollständigen Reduktion aller Cysteinreste eines Proteins. Das ist manchmal bei der Renaturierung von Vorteil (Rudolph *et al.* 1997); denn Disulfidbrücken bilden sich spontan nicht immer entsprechend der korrekten *in vivo*-Faltung aus und falsche Verknüpfungen im denaturierten Enzym könnten den Renaturierungsvorgang stören. Deshalb wurde die Renaturierung unter optimierten Bedingungen jeweils für nicht reduziertes und mit 100 mM DTT behandeltes Proenzym untersucht. Es zeigte sich, dass eine Vorbehandlung mit DTT ausgesprochen nachteilig ist; die Ausbeute sinkt auf 14 % der Vergleichsproben ohne DTT-Behandlung.

7.3.1.3 Renaturierungstemperatur

In weiteren Experimenten wurde geprüft, bei welcher Renaturierungstemperatur die höchste Ausbeute erreicht wird. Der untersuchte Bereich erstreckte sich von 10 °C bis 24 °C. Abb. 14 zeigt einen der Folgeversuche für einen kleineren Temperaturbereich. Man erkennt, dass 16 °C die höchsten Ausbeuten bringt, der Temperatureinfluss aber vergleichsweise gering ist.

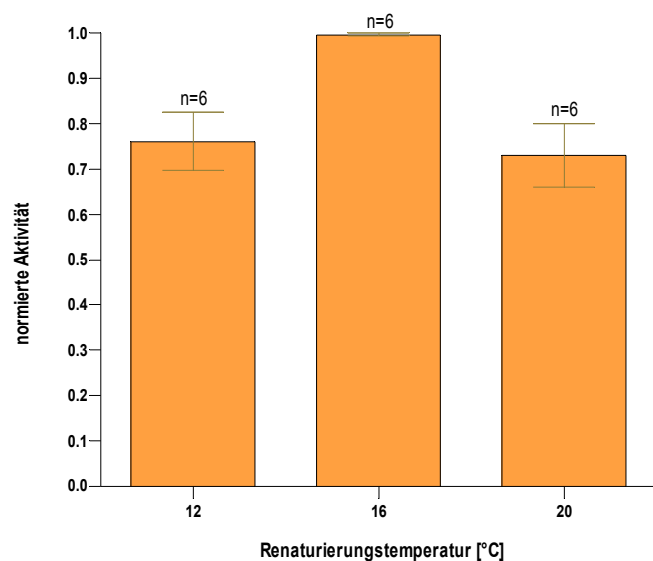


Abb. 14: Optimierte Renaturierungstemperatur

Prokathepsin F renaturierte 50 Stunden im optimierten Renaturierungsmedium (siehe Tab. 8). Es wurden gleichzeitig der Einfluss der Verdünnung (1/50, 1/66,67; 1/100, 1/150 und 1/200) und der Vorbehandlung mit 100 mM DTT (nur bei der Verdünnung 1/66,67) untersucht, so dass sich pro Temperatur sechs Messungen ergaben. Da in jeder Messreihe ein ähnliches

Temperaturverhalten beobachtet wurde, wurden alle Messungen nach Normierung zur Bestimmung der besten Renaturierungstemperatur gemittelt. Die Höhe der Säulen entspricht den Mittelwerten, die Antennen den Standardfehlern.

7.3.1.4 Renaturierungsmedium

Aus Versuchen mit anderen Kathepsinen, beispielsweise Kathepsin B (Kuhelj *et al.* 1995) und Kathepsin S (Tobbell *et al.* 2002), ist bekannt, dass bei Renaturierungsexperimenten *in vitro* die höchste Ausbeute im leicht alkalischen Milieu gefunden wird. Als Puffer wird meist 50–100 mM Tris pH 8.0–8.5 mit 5 mM EDTA und einem Redoxpaar (Cystein/Cystin oder reduziertes/oxidiertes Glutathion) verwendet (Brömme *et al.* 2004). Oft benutzte Zusätze zum Renaturierungsmedium sind Arginin, Salze wie Magnesiumchlorid, Detergenzien (Tsumoto *et al.* 2003) sowie Glycerol (Brömme *et al.* 2004). Diese und einige weitere, in unserer Arbeitsgruppe bewährte Zusätze wurden auf ihren Effekt auf die Renaturierung des Prokathepsin F überprüft. Tab. 8 zeigt, welche Faktoren insgesamt untersucht wurden.

Ziel war die Suche der optimalen Konzentrationen; meist wurde mit zentral zusammengesetzten faktoriellen Versuchsplänen 2. Ordnung gearbeitet, die in der Methodik ausführlich beschrieben sind.

Abb. 15 zeigt zwei Beispiele. Im Teil A ist die Wirkfläche zur gleichzeitigen Optimierung der Glycerol- und der Magnesiumchloridkonzentrationen zu sehen. Es deutet sich an, dass das Optimum für Glycerol über 40 % liegt; allerdings konnte aus praktischen Gründen (hohe Viskosität des Renaturierungsmedium und die Notwendigkeit anderer Zusätze) nicht mit noch höheren Konzentrationen gearbeitet werden. Wegen des schwachen Einflusses von $MgCl_2$

wurde dieses Salz im optimierten Medium am Ende nicht eingesetzt. Abbildungsteil B illustriert einen Teilaspekt der Optimierung des Redoxsystems, bestehend aus dem Tripeptid Glutathion in seiner reduzierten (GSH) und oxidierten Form (GSSG) und dem pH. Letzterer

Tab. 8: Untersuchte Einflussfaktoren auf die Renaturierung

Faktor	Einheit	Konzentrationsbereich		
		Minimum	Maximum	Optimum
GSH	mM	0	30	14
GSSG	mM	0	15	2
Glycerol	%	0	60	40
Arginin	mM	0	1000	650
MgCl ₂	mM	0	600	360 ^c
Mg ₂ SO ₄	mM	0	800	+ ^b
NaCl	mM	0	1500	+ ^b
(NH ₄) ₂ SO ₄	mM	0	750	+ ^b
Guanidin HCl	mM	0	500	n.e.
Refolding Optimizer	%	0	55	55 ^a
Vectrase	mM	0	1	n.e.
Saccharose	%	0	43	n.e.
Brij 35	%	0	0,1	n.e.
Tween 20	%	0	0,1	n.e.
Chaps	%	0	0,1	+ ^d
Triton X-100	%	0	0,05	+ ^d
PEG 150	%	0	33	n.e.
Octanoyl-N-methylglucamid	%	0	0,1	n.e.
pH		7.0	8.5	7.4

Alle Medien wurden mit 100 mM TRIS (7.2 < pH < 8.5) oder 500 mM HEPES (7.0 < pH < 8.2) gepuffert und mit 2 mM EDTA sowie 0.02 % NaN₃ versetzt.

+ positiver Effekt

n.e. ohne Effekt

^a ersetzt durch Glycerol, das denselben Effekt hatte

^b positiver Einfluss, aber wesentlich geringer als MgCl₂

^c ersetzt durch Arginin wegen höheren Einflusses

^d nicht optimiert wegen schwacher Abhängigkeit

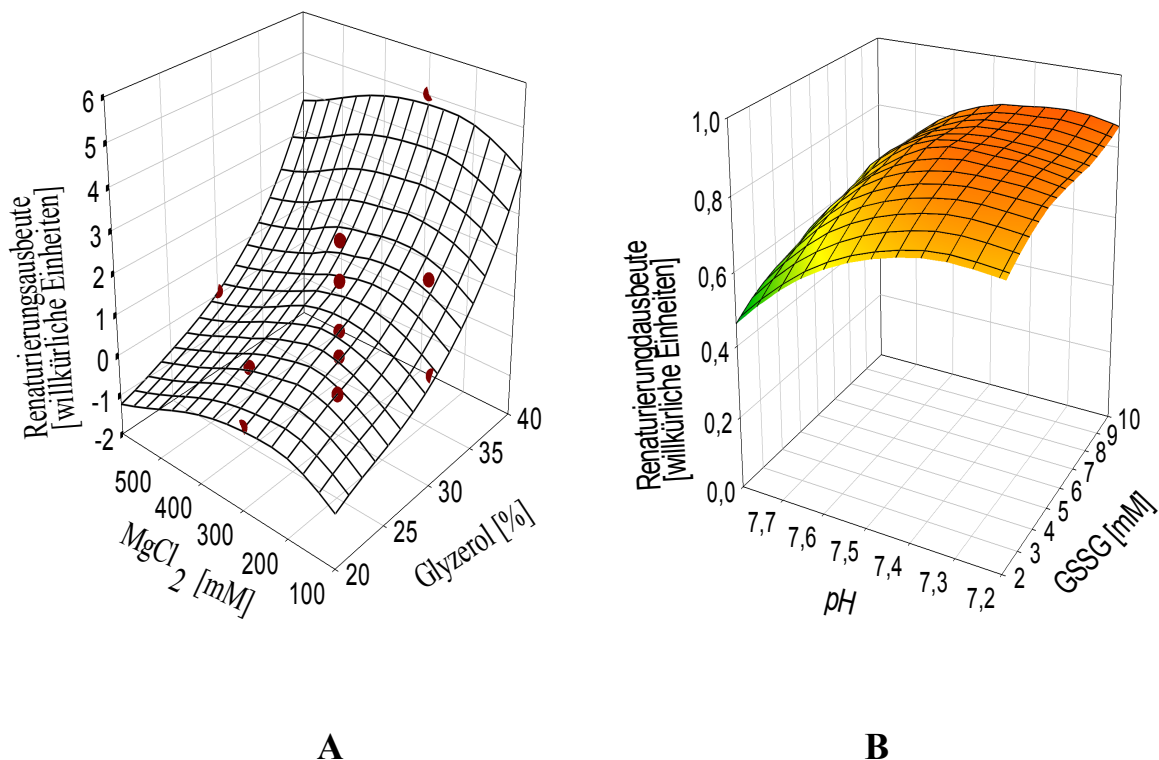


Abb. 15: Optimierung von Einflussfaktoren des Renaturierungsmediums mittels zentral zusammengesetzter Versuchspläne

Teil A: Prokathesin F wurde 1/100 mit dem Renaturierungsmedium verdünnt (20 mM GSH; 7 mM GSSG; 70 mM Tris; 30 % RO, 1 mM EDTA und 0,02 % Azid; Glyzerol- und MgCl₂-Konzentrationen variierten).

Teil B: Prokathesin F wurde 1/66,67 mit einem Renaturierungsmedium (50 mM Hepes; 40 % Glyzerol; 650 mM Arginin; 2 mM EDTA; 0,02 % Azid; GSH, GSSG und pH variierten) verdünnt. GSH wurde im selben Versuch optimiert, aber nicht mit dargestellt. Es wurde im Bereich von 10 bis 24 mM eingesetzt.

In beiden Versuchen erfolgte die Renaturierung bei 16 °C ohne vorherige Reduktion des Prokathesin F. Den Renaturierungsansätzen wurden in regelmäßigen Zeitabständen (A: 12 h, B: 5 h) jeweils acht Proben entnommen und bei -80 °C eingefroren. Die Prozessierungen der Proben (A: 120 min bei pH 4.0 und 37 °C mit 60 µM Pepsin; B: wie im Methodenteil unter 6.2.3.5 beschrieben) und die Aktivitätsmessungen (Methodenteil Abschnitt 6.2.4) erfolgten anschließend gemeinsam. Die Berechnung der Renaturierungsausbeute erfolgte unter Verwendung aller im Zeitverlauf gemessenen Werte mit Gleichung 6 (siehe Abb. 13 im Abschnitt 7.3.1) mit Hilfe von nichtlinearer Regression.

wirkt indirekt durch Beeinflussung der Dissoziation der Sulfhydrylgruppen. Der Einfluss des pH ist deutlich sichtbar; GSSG-Konzentrationen über 2 mM haben demgegenüber keinen signifikanten Effekt. In Zusatzversuchen konnte aber nachgewiesen werden, dass GSSG-Konzentrationen unter 2 mM zu einer deutlichen Verminderung der Renaturierungsausbeute führen.

Methodisch ähnlich wurde bei allen in der Tab. 8 aufgeführten Faktoren vorgegangen.

7.3.1.5 Verdünnung mit dem Renaturierungsmedium

Die Verdünnung der in GdnHCl gelösten Einschlusskörperchen mit dem Renaturierungsmedium war ein weiterer Faktor, der Einfluss auf die Renaturierungsausbeute haben könnte. Dabei wurden die Verdünnungsverhältnisse 1/50; 1/66,67; 1/100; 1/150 und 1/200 untersucht. Bei der Betrachtung der Konzentrationen an aktivem Enzym am Ende der Renaturierung gab es zwischen 1/50 und 1/66,67 keinen Unterschied; dann kam es erwartungsgemäß mit zunehmender Verdünnung zu einem Abfall. Für die Folgeversuche wurde die Verdünnung von 1/66,67 benutzt, da sie zwei praktische Vorteile hatte: 1. Im Vergleich zu den höheren Verdünnungen ergab sich eine bessere Nachweisbarkeit des Renaturierungserfolges durch die höheren Produktkonzentrationen im Aktivitätstest. 2. Im Vergleich zur 1/50-Verdünnung ergab sich eine Ersparnis an Prokathesin F bei der Herstellung der Renaturierungsansätze.

7.3.1.6 Inkubation mit dem Substrat Z-Phe-Arg-AMC

Bei den Versuchen zur Autoprozessierung des Prokathesin F fiel auf, dass während der kinetischen Messungen des vermuteten Prozessierungserfolges die Geschwindigkeit der Produktbildung anstieg. Ausgehend von einem vergleichsweise geringen Startwert kam es zu einer exponentiellen Aktivitätssteigerung um Faktoren zwischen 5 und 10 auf einen sehr stabilen Endwert. Da dieser Effekt nur bei einer gewissen Mindestverdünnung der Proben mit dem Testmedium deutlich zu sehen war und im interessanten Verdünnungsbereich ein ungewöhnlicher, *umgekehrt* proportionaler Zusammenhang zwischen Enzymaktivität und eingesetzter Enzymkonzentration beobachtet wurde, lag zunächst der Gedanke an die Anwesenheit von niedermolekularen Inhibitoren im Renaturierungsmedium nahe, die durch die Verdünnung mit dem Testmedium ihre Wirksamkeit verlieren. (Diese Untersuchungen wurden bis zu einem Verdünnungsverhältnis von 1/800 durchgeführt, dann limitierte die Nachweisgrenze des Aktivitätstestes.) Um diese Inhibitor-Hypothese zu prüfen, wurden die Proben vor der Aktivitätsmessung gegen das Testmedium dialysiert. Das hatte aber keinen Effekt auf den beobachteten

Aktivitätsverlauf (Versuche nicht dargestellt). Folglich mussten andere Ursachen gesucht werden, die dann letztlich in den Testbedingungen gefunden wurden. Diese unterschieden sich in vier Parametern von den Bedingungen der Autoprozessierung: pH, Proenzymkonzentration, Temperatur und Anwesenheit des Substrates.

Um zwischen dem Effekt der Verdünnung, des pH, der Temperatur und des Substrates unterscheiden zu können, wurden autoprozessierte Proben geteilt; die eine Hälfte wurde sofort in üblicher Weise getestet, die andere kam bei gleicher Temperatur und gleicher Verdünnung in ein Testmedium, das genau die gleiche Zusammensetzung hatte, aber kein Substrat enthielt. Als nach maximal 90 min die erste Serie einen stabilen Endwert erreicht hatte, wurde auch der zweiten Serie das Substrat zugesetzt und erneut beobachtet. Es ergab sich das gleiche Ergebnis wie in der ersten Serie (siehe Abb. 16).

Diese Experimente beweisen, dass die Anwesenheit des Substrates für die Aktivitätssteigerung verantwortlich ist. Aus elektrophoretischen Untersuchungen war schon bekannt, dass (i) auch nach Abschluss der Autoprozessierung noch reichlich Proenzym vorhanden ist (siehe Abb. 19) und dass (ii) der größte Teil des nach der Heteroprozessierung vorhandenen Proenzyms von Pepsin rasch abgebaut wird (Abb. 17). Damit liegt die folgende Erklärung nahe: Das Präparat enthält auch nach dem Renaturierungsschritt noch reichlich inaktives Proenzym, das unter Testbedingungen die native Konformation einnimmt und dann eine vergleichsweise geringe katalytische Aktivität entwickelt. In der Literatur sind Substrate schon als Faltungshilfen beschrieben worden (Rudolph *et al.* 1997). Die katalytische Wirksamkeit des Proenzyms wird in einem nachfolgenden Abschnitt (7.3.4) belegt; sie ist erwartungsgemäß im Vergleich zu den publizierten Daten des reifen Kathepsin F viel geringer.

Nach diesen unerwarteten Ergebnissen war es nahe liegend zu versuchen, dem Renaturierungsmedium Substrate des Kathepsin F zu zusetzen, um die Ausbeute zu steigern. Der positive Einfluss des Substrates war aber nur unter Testbedingungen bei pH 6.0 nachweisbar, denn bei allen Experimenten, bei denen 5-20 μM Z-Phe-Arg-AMC direkt in das Renaturierungsmedium gegeben wurde, ergab sich kein Vorteil gegenüber dem Medium ohne Substrat. Auch das ist nicht ungewöhnlich; es sind für andere Kathepsine Renaturierungsprotokolle publiziert worden, die mit einem Wechsel des Mediums verbunden waren (Kopitar *et al.* 1996).

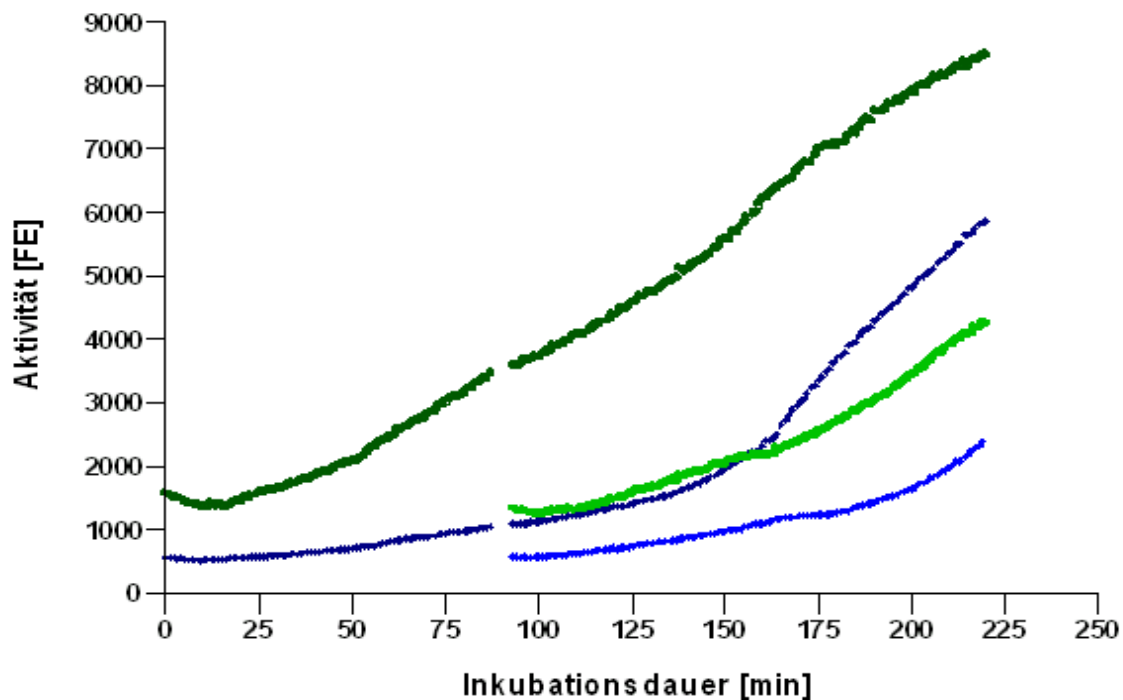


Abb. 16: Versuch zur Unterscheidung des Einflusses der Verdünnung und des Substrates auf die Aktivitätserhöhung

Prokathepsin F wurde 1/140 in Phosphatpuffer (100 mM pH 6.0; 2 mM EDTA; 2 mM DTT) verdünnt, dem entweder sofort (Messung beginnt zum Zeitpunkt 0) oder nach 90 min (Messung beginnt erst zu diesem Zeitpunkt) 20 μ M Substrat (Z-Phe-Arg-AMC [grün] bzw. Z-Leu-Arg-AMC [blau]) zugegeben wurde. Die Inkubation erfolgte im Probenschacht des Mikrotiterplatten-Fluorometers, dessen Temperatur über einen so langen Messzeitraum konstruktionsbedingt langsam von 26 auf 28 °C anstieg.

7.3.2 Prozessierung des Prokathepsin F

7.3.2.1 Prozessierung unter Katalyse mit Pepsin

Pepsin hat sich bei der heterokatalytischen Aktivierung der Prokathepsine L und S in der eigenen Arbeitsgruppe (Paul 2006, Kramer 2007) und auch schon bei der Aktivierung des Prokathepsin F bewährt (Wang *et al.* 1998, Fonovič *et al.* 2004). Die Pepsinbehandlung führt zur korrekten Trennung der Proregion von der reifen Enzymdomäne (Brömme *et al.* 2004). Wie auch in den zitierten Publikationen wurden in den eigenen Untersuchungen zur Prozessierung von Prokathepsin F mit Pepsin der zeitliche Anstieg der Enzymaktivität und die Molekulargewichtsänderung durch Verlust der Proregion verfolgt. Variiert wurden die vier Einflussfaktoren der Heteroprocessierung: Prozessierungsdauer von 2 min bis 6 h, Prozessierungstempera-

tur von 23,5 °C bis 40 °C, pH-Wert des Prozessierungsmediums von 2.25 bis 4.5 und die Pepsinkonzentration im Bereich von 6,25 nm bis 300 µM. Die Elektrophoresen (Abb. 17) zeigten ein unerwartetes Ergebnis.

Prokathepsin F wurde nur zum kleineren Teil zum reifen Enzym umgesetzt, zum größeren Teil jedoch zerstört. Diese Ergebnisse wurden so interpretiert, dass der nicht renaturierte Anteil abgebaut, der vollständig renaturierte Anteil korrekt aktiviert wird. Aufgrund der niedrigen Renaturierungsausbeute entstand durch Pepsinbehandlung nur wenig reifes Enzym, das nur im Aktivitätstest, nicht aber elektrophoretisch nachgewiesen werden konnte. Für diese Erklärung spricht auch die im Vergleich zu anderen Kathepsinen nur geringe Steigerung der Aktivität durch die Pepsinbehandlung. Im Vergleich mit der direkten Aktivitätsmessung des Proenzym (siehe Abschnitt 7.3.1.6) ohne Pepsinbehandlung muss jedoch erwähnt werden, dass die maximale Aktivität viel schneller mit Pepsin (ca. 20 min, siehe Abb. 18) als ohne Fremdprotease (> 3 h, siehe Abb. 16) erreicht wird.

Abb. 18 zeigt einen beispielhaften Versuch zu den Einflussfaktoren der Pepsinprozessierung. Aufgrund der negativen Ergebnisse in der Elektrophorese wurden weitere Anstrengungen unternommen, um bessere Versuchsbedingungen zu schaffen. Variiert wurde das Verdünnungsverhältnis des renaturierten Enzyms mit dem Prozessierungsmedium von 1/2 bis 1/20, der Puffer im Prozessierungsmedium (Zitrat 100 mM und Phosphat 100 mM) sowie die Pepsinhersteller (Serva und Aldrich). Dabei wurden keine nennenswerten Unterschiede gefunden. Auch die Aktivitätsmessung wurde variiert: In einem Versuch wurden statt des im Methodenteil beschriebenen Verfahrens weiße Mikrotiterplatten und ein anderer Reader (Infinite M200 der Firma Tecan) benutzt. Schließlich wurde noch versucht, zunächst eine Nachrenaturierung durch das Substrat durchzuführen und erst anschließend die Pepsinprozessierung zu starten. Aber auch dabei kam es zu keiner Steigerung der Prozessierungsausbeute über den in Abb. 18 illustrierten Bereich hinaus. Eine systematische Optimierung durch Experimente auf der Grundlage von zentral zusammengesetzten Versuchsplänen 2. Ordnung wie bei der Renaturierung war wegen der zu geringen Menge an renaturiertem Proenzym nicht möglich.

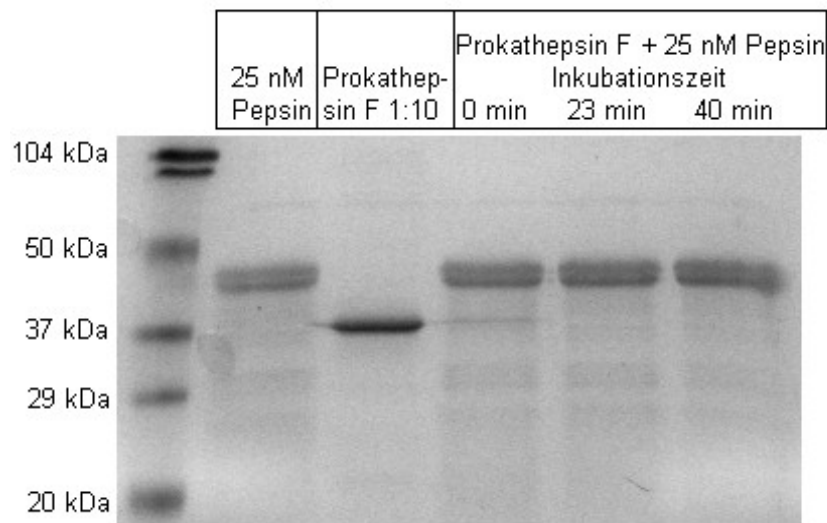


Abb. 17: Elektrophoretische Kontrolle der Pepsinprozessierung des Prokathepsin F

Die Elektrophoresen erfolgten im 15 %-igen Gel wie im Methodenteil unter 6.2.3.1 beschrieben. Die Inkubation von Prokathepsin F mit 25 nM Pepsin erfolgte bei 28.5 °C in 100 mM Zitratpuffer pH 3.5

mit 2 mM EDTA und 2 mM DTT. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden dem gemeinsamen Ansatz Aliquots entnommen, mit 5x Probenpuffer versetzt und sofort auf 95 °C erhitzt. Zum Vergleich wurden Pepsin und Prokathepsin F in den jeweils zur Prozessierung genutzten Konzentrationen mit aufgetragen.

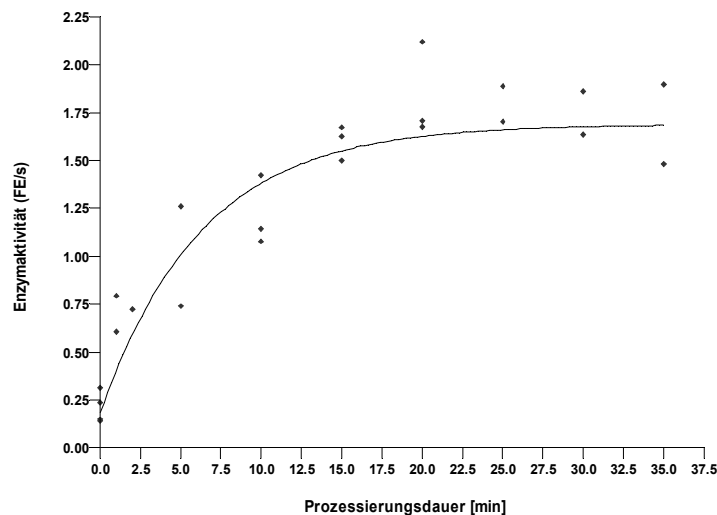


Abb. 18: Zeitverlauf der Pepsinprozessierung

Das Prozessierungsmedium enthielt 100 mM Zitratpuffer pH 3.5 und 25 nM Pepsin (Serva). Es wurde im Verhältnis 1/5, 1/10 und 1/20 mit renaturiertem Prokathepsin F gemischt. Die Prozessierung erfolgte bei 20 °C. Dargestellt sind die auf gleiche Enzymmenge normierten Messwerte für alle Verdünnungen. Die eingezeichnete

Kurve wurde unter Verwendung von

$$Y = Y_{\max} \times (1 - \exp(-K \times X)) + Y_0$$

Gleichung 7

mittels nichtlinearer Regression berechnet. Y_{\max} bezeichnet die maximale Enzymaktivität, Y_0 die Ausgangsaktivität und K ist die Geschwindigkeitskonstante. Es lässt sich eine Steigerung der Enzymaktivität auf ca. das 7-fache mit maximaler Aktivierung nach 20 min erkennen.

7.3.2.2 Autoprozessierung

Die Autoprozessierung verläuft ohne Anwesenheit einer Fremdprotease und hat daher den Vorteil, dass diese vor der weiteren Verwendung des prozessierten Materials nicht wieder entfernt werden muss. Zwar sind die autokatalytisch aktiven Kathepsine N-terminal um 2 bis 6 Aminosäuren länger als *in vivo*, das hat jedoch keinerlei Auswirkungen auf deren Aktivitäten (Brömme *et al.* 2004). Autoprozessierungsreaktionen können mono- oder bimolekular verlaufen. Im ersten Fall kommt es zu einer Konformationsänderung des Proenzym, so dass die zu spaltende Peptidbindung ins katalytische Zentrum gelangt und hydrolysiert wird. Beim bimolekularen Mechanismus katalysiert spontan gebildetes reifes Enzym die Prozessierung des Proenzym. Es wurden insgesamt 13 Versuchsreihen zur Autoprozessierung durchgeführt.

Die vier Faktoren, die Einfluss auf diese Reaktion haben, wurden in einem weiten Bereich variiert: die Temperatur von 20 bis 40 °C, die Reaktionszeit von 2 Minuten bis 72 Stunden, die Verdünnung des Proenzym von 1/2 bis 1/800 und der pH des Mediums von 3.5 bis 6.6. Kontrolliert wurde der Erfolg der Autoprozessierung neben der obligaten Aktivitätsmessung auch mittels SDS-PAGE und MALDI. Ein massiver Anstieg der Enzymaktivität um Faktoren von etwa 100, wie das bei anderen Kathepsinen beobachtet wurde (Kramer *et al.* 2007), trat nie ein. Bei der üblichen Proenzymkonzentration lagen die Ausgangswerte erwartungsgemäß an der unteren Nachweisgrenze und der vermutete Aktivitätszuwachs war nicht sicher messbar. Bei sehr hohen Konzentrationen an Proenzym war dann dessen geringe katalytische Aktivität gut messbar und es kam während der kinetischen Messungen zu einer deutlichen Zunahme der Enzymaktivität. Dieses Phänomen und die Konsequenzen sind bereits im Abschnitt 7.3.1.6 ausführlich beschrieben worden (Abb. 16).

Die Autoprozessierung ist definitionsgemäß mit einer Molekulargewichtsänderung verbunden. Danach wurde mittels Elektrophorese und MALDI-ToF gesucht. In allen Elektrophoresen blieb die Bande des Prokathesin erhalten, ohne dass eine neue Bande mit kürzerem Molekulargewicht hinzu trat (Abb. 19). Auch massenspektrometrisch konnte nie ein deutlicher Gipfel mit einem Molekulargewicht unterhalb des Proenzym nachgewiesen werden.

Obwohl die Prokathesin-F-Bande in der elektrophoretischen Trennung (Abb. 19) als auch der entsprechende Gipfel bei der Massenspektroskopie keine eindeutige Intensitätsabnahme während der Inkubationszeit erkennen ließen, wurden mögliche Artefakte durch Bindung des Prozessierungsprodukts an die Oberfläche der verwendeten Reaktionsgefäße aus Kunststoff ausgeschlossen. In einer ersten Versuchsreihe wurden dem Prozessierungsmedium verschiedenen Detergenzien (2-5 % DMSO; 0.05-0.1 % Triton; 0.05-0.1 % Chaps; 0.05-0.1 % Brij 35)

zugesetzt und im zweiten Experiment benutzte ich zur Inkubation Glasküvetten, in denen in regelmäßigen Zeitabständen das Spektrum der endogenen Tryptophanfluoreszenz gemessen wurde. Durch die Prozessierung würde sich die Zahl der Tryptophanreste vermindern, was zu einer Veränderung des Emissionsspektrums führt. Auch eine Proteinbindung an die Glasoberfläche hätte zu einer Verminderung der Signalhöhe geführt. Aber in diesem Versuch blieben alle Parameter während der Beobachtungszeit gleich.

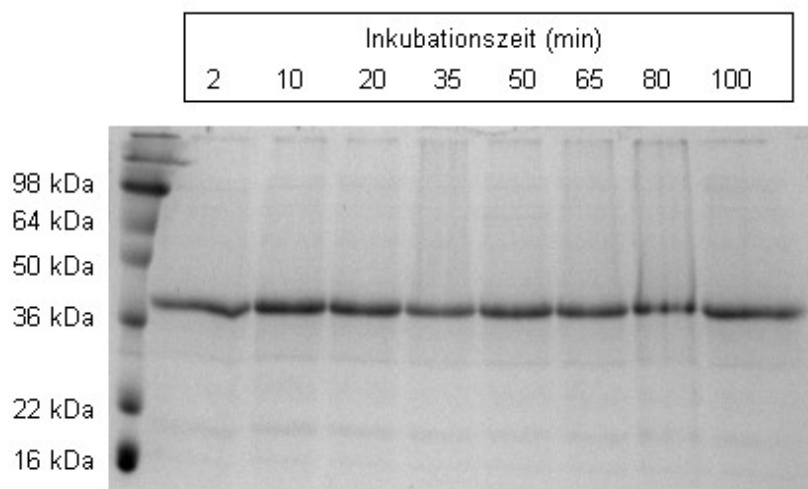


Abb. 19: Kontrolle des Molekulargewichtes während eines Versuches zur Autoprozessierung

Prokathesin F wurde im Verhältnis 1/10 mit Autoprozessierungspuffer (150 mM Azetat; 2 mM EDTA; 5 mM DTT pH 5.0) gemischt und bei 22 °C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben zur Elektrophorese (siehe Methodenteil 6.2.3.1) und zur Aktivitätsmessung (Methodik unter Punkt 6.2.4, die Ergebnisse sind im Text beschrieben) entnommen.

Alle geschilderten Experimente lassen nur den Schluss zu, dass eine Autoprozessierung des kurzen Prokathesin F nie gelang. Auf mögliche Gründe wird in der Diskussion eingegangen.

7.3.3 Bestimmung des k_{cat} -Wertes für Prokathesin F

Die Konzentrationsbestimmung an aktivem Enzym ist Voraussetzung zur Berechnung der katalytischen Konstante (k_{cat}). Dazu wurde mit E64 titriert und mit Hilfe der Titrationsgleichung (Gleichung 8) die Enzymkonzentration berechnet. Abb. 20 Teil A zeigt den entsprechenden Versuch für eine nicht reduzierend denaturierte und anschließend renaturierte und konzentrierte Prokathesin-F-Charge. Es ergab sich eine Enzymkonzentration von 2,225 μM . Zur Be-

stimmung von k_{cat} wurde die Reaktionsgeschwindigkeit des ungehemmten Prokathepsin F (Y_0 -Wert aus Abb. 20 A) unter Verwendung der Eichkurve (Abb. 20 B) in $\mu\text{M Produkt} \times \text{s}^{-1}$ umgerechnet und danach durch die mikromolare Enzymkonzentration ($[E_t]$ aus Abb. 20 A) dividiert. Es ergab sich eine Wechselzahl $k_{\text{cat}} = 2,4 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$, auf die in der Diskussion ausführlich eingegangen wird.

7.3.4 K_M -Wert-Bestimmung für Prokathepsin F

Da bereits das Proenzym hydrolytisch aktiv war und weder die Behandlung mit Pepsin noch die Autoprozessierung die Enzymaktivität bedeutend steigern konnten, wurden direkt im Anschluss an die Renaturierung Aktivitätsmessungen zur Charakterisierung des Proenzym vorgenommen und versucht, einen K_M -Wert für das Proenzym zu ermitteln.

Abb. 21 zeigt das Ergebnis entsprechender Versuche. Die höchste Enzymaktivität wurde bei einer Substratkonzentration von 20-30 μM gefunden, danach sank sie wieder ab. Dieses Phänomen der Substrathemmung bei Kathepsinen ist sowohl aus der Literatur (Vasiljeva *et al.* 2003) als auch aus der eigenen Arbeitsgruppe (Kleint 2005) gut bekannt und typisch für den Umsatz von künstlichen Peptidsubstraten durch Proteasen. Aus den Messwerten konnten allerdings durch nichtlineare Regressionen unter Verwendung der Gleichung 5 für die Substrathemmung von Enzymen, die ansonsten einen Michealis-Menten-Mechanismus aufweisen, weder die Hemmkonstante des Substrates gegenüber dem Enzym (K_i) noch die Michaelis-Menten-Konstante für das eingesetzte Substrat (K_M) zuverlässig ermittelt werden.

Da es nicht Ziel der Arbeit war, das Proenzym detailliert zu charakterisieren, sondern mit der Versuchsreihe nur die für eine zuverlässige und empfindliche Messung notwendige Substratkonzentration im Testmedium bestimmt werden sollte, wurden keine weiteren Anstrengungen zur genaueren Quantifizierung der kinetischen Konstanten unternommen. Das oben genannte qualitative Ergebnis ist ausreichend um den Prokathepsin-F-Test so zu gestalten, dass damit Renaturierungsausbeuten zuverlässig bestimmt werden können. Auf den molekularen Mechanismus der Substrathemmung wird in der Diskussion eingegangen.

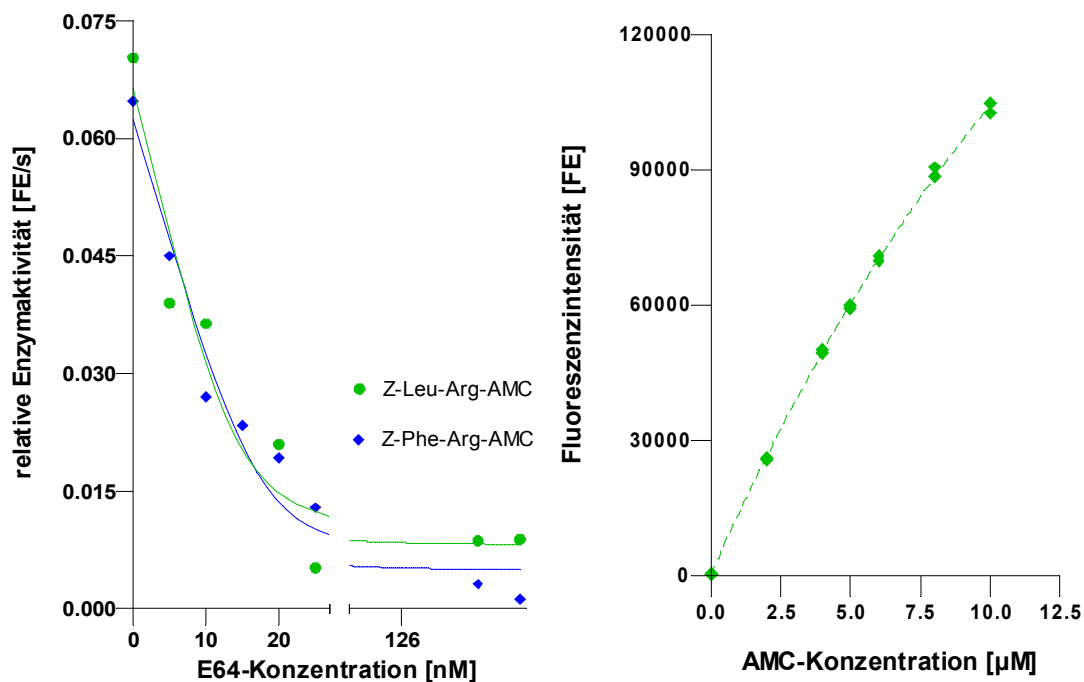


Abb. 20: Bestimmung des k_{cat} -Wertes für Prokathepsin F

Teil A: In acht Wells einer F-MTP wurde Testmedium mit 18 μM Z-Phe-Arg-AMC oder Z-Leu-Arg-AMC und 0 bis 210 nM E64 pipettiert und mit jeweils 2,5 μl Enzymlösung vermischt. Unmittelbar anschließend wurde die Enzymaktivität 30 min lang kinetisch gemessen. Die mit zwei unterschiedlichen Substraten ermittelten mittleren Reaktionsgeschwindigkeiten sind als Funktion der E64-Konzentration dargestellt. Die Auswertung erfolgte durch nichtlineare Regression unter Verwendung der Titrationsgleichung:

$$Y = Y_0/Y_t \times (\text{SQRT}((K_i + X - Y_t) \times (K_i + X - Y_t)/4 + Y_t \times K_i) - (K_i + X - Y_t)/2) + C \quad \text{Gleichung 8}$$

Y bezeichnet die freie Enzymkonzentration; X die E64-Konzentration; Y_t die totale Enzymkonzentration. Y_0/Y_t ist ein Proportionalitätsfaktor, der die Angabe der Enzymaktivität in willkürlichen Einheiten zulässt, und K_i die Inhibitionskonstante.

Teil B: Dargestellt ist die Eichkurve für die Messung von AMC mit dem Fluorometer Spectra Max Gemini bei Standard-Messbedingungen (360 nm Anregungswellenlänge, 440 nm Emissionswellenlänge, weiße F-Well-Platten, siehe auch Methodenteil 6.2.4). Die eingezeichnete Eichkurve gilt für den gesamten Messbereich und wurde mit der Gleichung für eine exponentielle Eichkurve (Gleichung 9) errechnet.

$$Y = A \times X \times \exp(-B \times X) + C \quad \text{Gleichung 9}$$

Der für die k_{cat} -Berechnung (Produktkonzentration sehr klein) relevante Proportionalitätsfaktor entspricht der Anfangssteigung dieser Kurve und beträgt 11989 FE / μM Aminomethylcumarin.

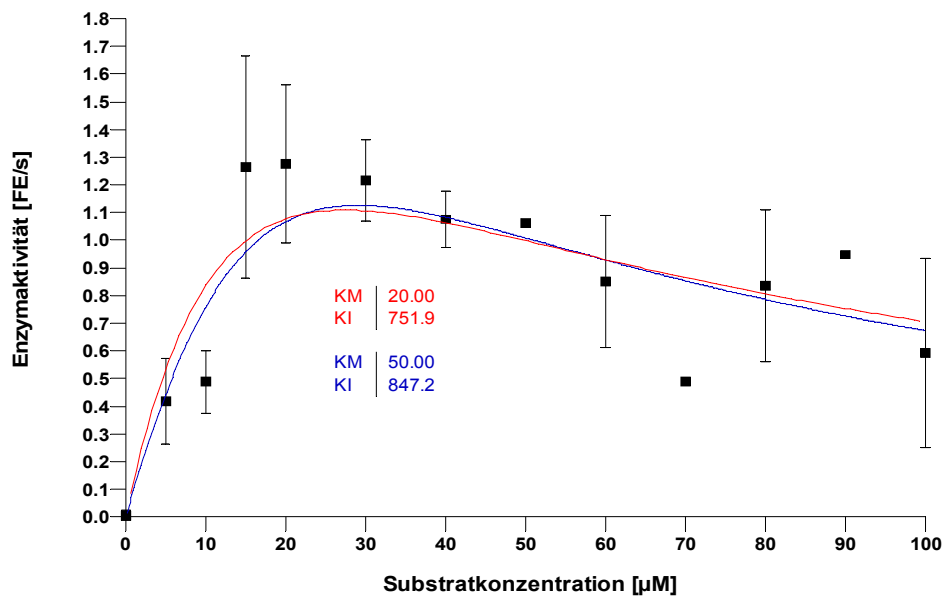


Abb. 21: Versuch der K_M -Bestimmung

Dem Testmedium wurde Prokathepsin F im Verhältnis 1/100 zugesetzt (pro Well 2,5 μ l Enzym zu 247 μ l Testpuffer). Es hatte folgende Zusammensetzung: Zitratpuffer 100 mM pH 6.0; 2 mM DTT; 2 mM EDTA; max. 1 vol% DMSO; variable (5-100 μ M) Konzentration von Z-Phe-Arg-AMC. Die Aktivitätsmessungen erfolgten wie unter 6.2.4 beschrieben über 15 min. Die Grafik enthält die Ergebnisse von drei unabhängigen Einzelversuchen, in denen in der Regel Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Es sind der Mittelwert (Symbol) und der Standardfehler (Antennen) abgebildet. Die beiden Kurven wurden durch nichtlineare Regression (Gleichung 5) unter Fixierung des K_M auf die im Inset angegebenen Werte ermittelt, um zu zeigen, dass K_M -Werte von 20 bis 50 mM zu fast identischen Kurven führen.

7.4 Inhibitionsstudien des Propeptides vom Kathepsin F mit verwandten Cysteinproteasen

Während die Enzymdomänen innerhalb der Familie der Cysteinproteasen recht ähnlich strukturiert sind, gibt es starke Unterschiede zwischen den Proregionen. Die Propeptide können ihr Mutterenzym (erstmal entdeckt beim Kathepsin B, Fox *et al.* 1992), aber auch verwandte Kathepsine inhibieren (Übersicht bei Wiederanders *et al.* 2003). Dabei wird das Ausmaß der Hemmung verwandter Kathepsine als Hinweis auf strukturell und funktionell sehr ähnliche Proteinabschnitte aufgefasst und daraus versucht, den Verwandtschaftsgrad zwischen den Kathepsinen zu erkennen.

Der hemmende Einfluss des Kathepsin-F-Propeptides auf die Kathepsine F, L, H und S wurde, wie im Methodenteil beschrieben (6.2.7), im Konzentrationsbereich von etwa 50 nM bis 300 nM untersucht. Weder Pepsin behandeltes noch natives Prokathepsin F, ebenso wie die Kathepsine H und S ließen sich durch Zugabe von 0,3 μ M des gereinigten Propeptides inhibieren (nicht dargestellt). Daraus ergeben sich folgende Schlussfolgerungen: 1. Die Kathepsine H und S werden nicht durch das Kathepsin-F-Propeptid gehemmt. 2. Eine eindeutige Aussage zur Wechselwirkung zwischen dem Kathepsin-F-Propeptid und seinem Mutterenzym ist nicht möglich, weil für dieses Experiment keine reine Kathepsin-F-Präparation zur Verfügung stand. Die fehlende Hemmwirkung in dem Experiment mit Pepsin behandeltem Prokathepsin F ist vermutlich die Folge des raschen Abbaus des zugesetzten Propeptides durch Pepsin. Dieser Versuch wäre nur im Fall einer nachweisbaren Hemmung interessant geworden; das war schon bei der Planung klar (Näheres dazu in der Diskussion).

Die Funktionstüchtigkeit des Kathepsin-F-Propeptides zeigte sich dann in Versuchen mit Kathepsin L: Die Produktbildung unter dem Einfluss des gereinigten Propeptides vom Kathepsin F wurde geringer; und zwar umso stärker, je höher dessen Konzentration war. Näheres zu diesem Hemmmechanismus wird ebenfalls im Diskussionsteil erläutert. Um zu kontrollieren, ob die partielle Zerstörung des Propeptids während der Reinigung zu einer Beeinträchtigung seiner inhibitorischen Funktion geführt hat, wurden die Inhibitionsversuche mit den Kathepsinen S und L auch mit dem ungereinigten Material durchgeführt (wie im Methodenteil 6.2.7 beschrieben). Es ergaben sich die gleichen Ergebnisse. Die Hemmwirkung wurde gegenüber Kathepsin L für das ungereinigte und das gereinigte Propeptid durch die Bestimmung des K_i quantifiziert (Abb. 22). Die Ergebnisse stimmen gut überein (121 bzw. 82,5 nM).

Denkbar ist natürlich auch, dass das Kathepsin-F-Propeptid ein gutes Substrat für das Kathepsin L darstellt. Dann würden aufgrund der Konkurrenz des Propeptides mit dem im Test eingesetzten fluorogenen Substrat Z-Phe-Arg-AMC ebenso die gemessenen Aktivitäten zurückgehen, ohne dass aber eine tatsächliche Inhibition vorliegt. Um auszuschließen, dass den Ergebnissen solch ein Mechanismus nicht zugrunde liegt, wurde ein weiterer Inhibitionsversuch mit Kathepsin L unter elektrophoretischer Kontrolle durchgeführt (Abb. 23).

Man erkennt, dass es während der 45-minütigen Inkubationszeit zu keiner sichtbaren Veränderung der Propeptidbande kommt. Das beweist, dass die auch in diesem Zusatzexperiment beobachtete Verringerung der Kathepsin-L-Aktivität durch eine echte Inhibition und nicht durch Konkurrenz mit einem anderen, nicht fluorogenen Substrat hervorgerufen wird.

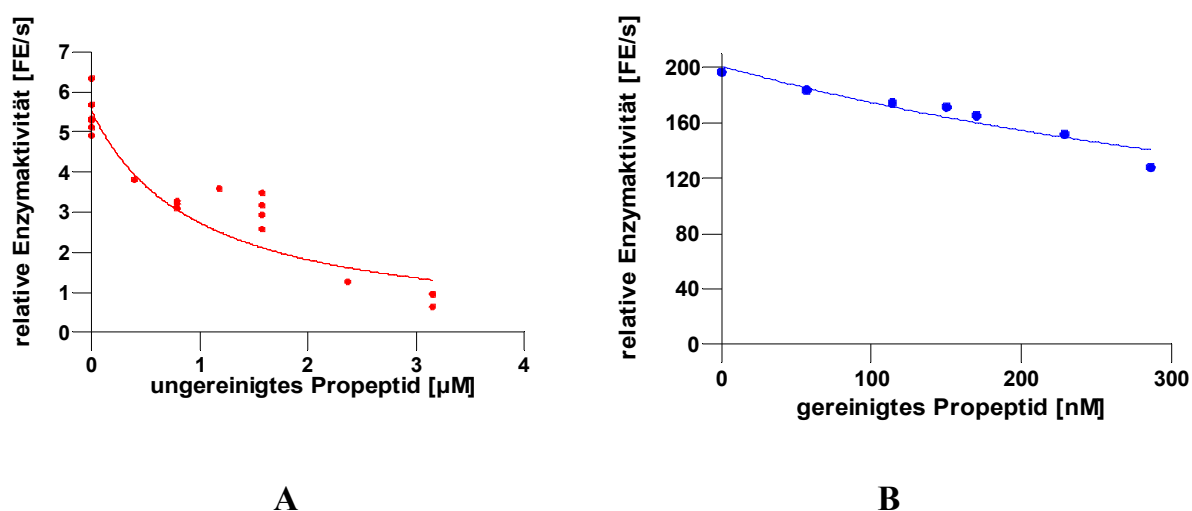
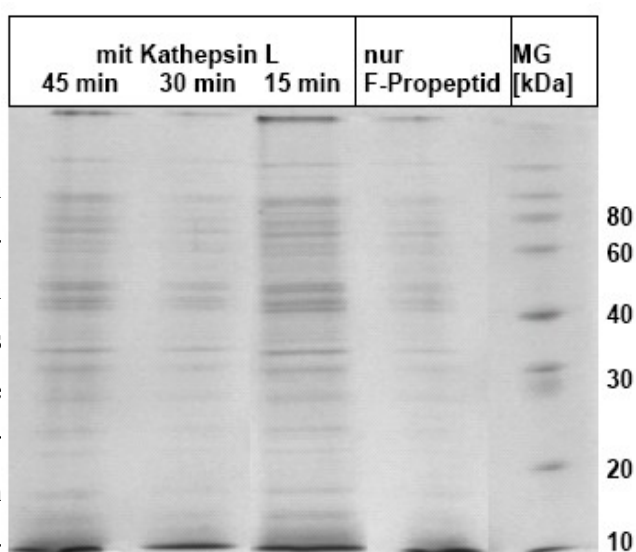


Abb. 22: : Hemmwirkung des Kathepsin-F-Propeptides auf Kathepsin L

Zunächst erfolgten kinetische, fluorometrische Messungen über 15 min mit verschiedenen Propeptidkonzentrationen wie unter 6.2.7 im Methodenteil beschrieben. Beim ungereinigten Propeptid wurden zu jeder Propeptidkonzentration (bis 3,2 μM) Vierfach-Bestimmungen durchgeführt, beim gereinigten Propeptid (bis 286 nM) unter Kenntnis von Voruntersuchungen in dem gezeigten Versuch nur Einfachbestimmungen. 15,24 nM Kathepsin L reagierten im Testmedium (125 mM Na⁺-K⁺-Phosphat pH 6.1; 2 mM EDTA; 2 mM DTT; 0.01 % Triton X 100) mit 5 μM Z-Phe-Arg-AMC. Es wurden die Kurvenanstiege bei den verschiedenen Propeptidkonzentrationen zur Ermittlung eines K_i-Wertes mit Hilfe der Gleichung 5 genutzt. Dieser beträgt 121 ± 21.03 nM für das ungereinigte und 82.48 ± 14.12 nM für das gereinigte Propeptid.

Abb. 23: Elektrophoretische Kontrolle zum Ausschluss des Abbaus des Kathepsin-F-Propeptides durch Kathepsin L

Es wurde ein Inhibitionsexperiment unter den gleichen Bedingungen wie im Methodenteil unter 6.2.7 beschrieben durchgeführt. Zugegeben wurden 3,15 μM ungereinigtes Propeptid. Es erfolgte eine kontinuierliche fluorometrische Messung des Z-Phe-Arg-AMC-Umsatzes über 45 min. Im Abstand von 15 min wurden aus den Wells Proben für die Elektrophorese entnommen, in 5 x-Probenpuffer aufgenommen und anschließend gemeinsam in einem 12,5 %-igen Gel getrennt (siehe Methodenteil 6.2.3.1). Die Bahn ohne Enzym dient der Kontrolle. Die Propeptidbande (11,9 kDa) ist am unteren Gelrand zu sehen.



8. DISKUSSION

Das Interesse der Arbeitsgruppe gilt den Struktur-Funktions-Beziehungen der Proregionen von Cysteinproteasen der Papainfamilie. Bisher konnte gezeigt werden, dass die Proregionen für die Zielsteuerung des Proenzym zu den Zellkompartimenten, die Faltung und die Hemmung des reifen Enzyms verantwortlich sind (Wiederanders *et al.* 2003).

Eine besonders interessante Proregion besitzt das Kathepsin F, das Gegenstand meiner Arbeit war. Mit 251 Aminosäuren ist sie die längste Proregion unter allen bekannten Cysteinproteasen der Säugetiere. Das reife Enzym und der C-terminale Teil der Proregion zeigen Homologien mit den anderen Familienmitgliedern, aber am N-Terminus befindet sich zusätzlich eine Cystatin-ähnliche-Domäne, die bisher bei noch keiner anderen Cysteinprotease identifiziert wurde. Von ihr wird angenommen, dass sie wegen der Sequenzähnlichkeit mit Cystatinen aus verschiedenen Spezies das reife Enzym inhibieren könnte (Nägler *et al.* 1999¹), wie das in der Einleitung bereits ausführlich dargestellt worden ist. Außer der Aminosäuresequenz ist über Struktur und Funktion der Kathepsin-F-Proregion bisher noch nichts bekannt - im Gegensatz zu den Proregionen der meisten anderen menschlichen Papainfamilienmitglieder, wie beispielsweise Kathepsin S (Pietschmann *et al.* 2002), L und H (Benedix 2007), B und X (Beckmann 2006) sowie K (Kleint 2005). Wie diese Auflistung zeigt, gibt es beim Experimentieren mit humanen Cysteinproteasen und deren Proregionen in der Arbeitsgruppe langjährige methodische Erfahrungen, auf deren Grundlage die Funktion der Proregion des Kathepsin F untersucht werden sollte.

Aus der Literatur war bekannt, dass (1) sich Prokathepsin F in *Pichia pastoris* (Wang *et al.* 1998, Somoza *et al.* 2002, Ho *et al.* 2002) und Sf9-Insektenzellen (Fonovič *et al.* 2004) nicht vollständig exprimieren lässt, (2) zur Autoprocessing widersprüchliche Ergebnisse erhalten wurden (Wang *et al.* 1998, Fonovič *et al.* 2004) und (3) der Zusatz von Pepsin zur Prozessierung nicht nur die Proregion, sondern auch das reife Enzym zu über 50 % zerstört (Ho *et al.* 2002). Es war daher abzusehen, dass die Zielstellung der Arbeit – Herstellung und Charakterisierung der Kathepsin-F-Proregion – nicht einfach zu lösen sein wird. Mein Plan war die Verwendung bakterieller Expressionssysteme, die von der Arbeitsgruppe schon mehrfach bei ähnlichen Vorhaben erfolgreich eingesetzt wurden. Der Plan erschien realistisch, denn dieser vergleichsweise einfache Ansatz wurde beim Prokathepsin F noch nie probiert; lediglich die erfolgreiche Expression eines Fusionsproduktes der Enzymdomäne mit der Glutathion-S-Transferase in *E. coli* ist bisher beschrieben worden (Santamaría *et al.* 1999).

Wegen des Fehlens der kompletten Proregion konnte sich dieses Fusionsfragment aber nicht korrekt falten und hatte nur eine verschwindend geringe katalytische Wirkung. Dieses Negativ-Ergebnis war bei der Planung meiner Versuche berücksichtigt worden; alle DNA-Konstrukte enthielten entweder die vollständige Proregion (251 AS) oder den zu den übrigen Mitgliedern der Papainfamilie homologen Teil (101 AS, siehe auch Abb. 6 im Ergebnisteil 7.1.1). Letztlich gelang mir aber nur die bakterielle Herstellung der verkürzten Proteine. Der Einschluss der Cystatin-ähnlichen Domäne verhindert auf bislang unbekannte Weise die Expression. Da das erhebliche Konsequenzen für den geplanten Ablauf hatte (Wegfall aller Experimente zur Funktion der Cystatin-ähnlichen Domäne des Propetids), habe ich mit erheblichem Aufwand nach möglichen Ursachen dieses Misserfolges gesucht und insbesondere das Codon-Usage-Problem analysiert.

Codon-Usage und Expression der Cystatin-ähnlichen Domäne

Seit langem ist bekannt, dass die Expression und damit die zytosolische Konzentration der tRNAs für die verschiedenen Codons in allen Bakterienspezies sehr unterschiedlich, nahezu artspezifisch ist (Ikemura *et al.* 1981). Dabei ist deren Konzentration optimal auf die Anzahl der komplementären Codons im eigenen Genom abgestimmt (Ikemura *et al.* 1981). Sie ändern sich sogar mit der Wachstumsrate, d.h. die tRNA-Verteilung passt zu dem Proteinmuster, das spezifisch für die entsprechende Wachstumsgeschwindigkeit ist. Das relative Verhältnis der tRNAs im Zytosol der Zelle spiegelt also deren Ansprüche an die Translation wider (Ikemura *et al.* 1981). Untersuchungen mit Phagengenomenen zeigten, dass die Korrelation zwischen Codons in deren Genom und den tRNAs des Wirtsorganismus weit weniger stark, jedoch höher als im Vergleich mit anderen, zufällig ausgewählten Genomen ist (Ikemura *et al.* 1981). Wenn in *E. coli* das artfremde humane Kathepsin F produziert werden soll, könnte es also aufgrund eines relativen Mangels der benötigten tRNAs zum vorzeitigen Abbruch der Translation kommen. Das Phänomen tritt generell bei heterologer Expression auf, also auch in anderen Wirtsorganismen wie beispielsweise Hefezellen. Es ist umso größer, je höher die Wachstumsrate der Wirtszellen ist, d.h. je mehr „seltene“ tRNAs pro Zeiteinheit benötigt werden (Ikemura *et al.* 1981; Dong *et al.* 1996), und je mehr „seltene“ tRNAs in der zu exprimierenden Sequenz vorkommen. Da sich insbesondere am N-Terminus des humanen Prokathesin F die „seltenen“ Codons häufen (Tab. 7, Abschnitt 7.1.1), waren sowohl in *E. coli* als auch in *P. pastoris* vor allem bei der Cystatin-ähnlichen Domäne Probleme zu erwarten. Auch Versuche mit dem *E.coli*-Rosetta-Stamm, der für Codon-Usage-Probleme

gedacht ist und durch ein zusätzliches Plasmid tRNAs für 5 sonst selten exprimierte Aminosäuren verstärkt produzieren kann, hatten keinen Erfolg (siehe auch Ergebnisteil 7.1.1).

Renaturierung des verkürzten Prokathepsin F

Um doch noch aktives Kathepsin F zur Durchführung der geplanten Inhibitionsstudien mit dem Propeptid zu gewinnen, konzentrierte ich mich auf die Herstellung der verkürzten Form, was ursprünglich nur zu Vergleichszwecken mit den Literaturdaten geplant war. Verkürztes Prokathepsin F ließ sich zwar bakteriell vergleichsweise gut exprimieren, jedoch nur schwer in die native, enzymatisch aktive Konformation falten. Bei pauschaler Betrachtung erscheint das nicht verwunderlich, denn nach Anfinsens Theorie der Proteinfaltung besitzt nur die vollständige Primärstruktur die Information zur Ausbildung der Tertiärstruktur (Anfinsen 1973). Im konkreten Fall war ich aber davon ausgegangen, dass sich Kathepsin F auch ohne Cystatin-ähnliche Domäne korrekt falten kann, denn seine Struktur zeigt starke Ähnlichkeiten mit dem Kathepsin W (siehe Einleitung 4.1, Abb. 1 und Tab. 9), welches seine Konformation spontan ausbildet, jedoch nicht katalytisch aktiv ist (Bühling *et al.* 2000). Offensichtlich ist die Cystatin-ähnliche Domäne aber doch zur korrekten Faltung des Prokathepsin F notwendig. Dies ist ein erstes, wenn auch unerwartetes Ergebnis meiner Untersuchungen und die erste (indirekt) nachgewiesene Funktion der Cystatin-ähnlichen Domäne. Der offensichtliche Misserfolg der ersten Renaturierungsexperimente hat mich nicht davon abgehalten, die Renaturierungsversuche fortzusetzen, denn es ist bekannt, dass durch Zusatz spezieller Substanzen (z.B. RO, Glyzerin) auch Teilsequenzen eines Proteins in die native Konformation gebracht werden können, wenn auch oft nur mit geringerer Ausbeute. So ist beispielsweise beim Kathepsin S gezeigt worden, dass die Renaturierungsausbeute zwar um zwei Größenordnungen geringer ausfällt, wenn die Proregion fehlt, aber dennoch messbare Enzymaktivität entsteht (Tobbell *et al.* 2002). Der eigenen Arbeitsgruppe gelang ebenfalls die Renaturierung einer Cysteinprotease ohne Proregion, nämlich beim Kathepsin B. Aber auch hier bewirkte der Zusatz des Propeptides (d.h. der isolierten Proregion) zum Renaturierungsmedium eine Steigerung der Ausbeute um eine Größenordnung (Beckmann 2006). Die korrekte Faltung des Falcipain 2, einer Cysteinprotease der Papainfamilie aus *Plasmodium falciparum*, ist mit guter Ausbeute (zwischen 53 und 76 %) sogar gänzlich ohne Proregion möglich (Sijwali *et al.* 2002).

Bei den Versuchen zur Erhöhung der Renaturierungsausbeute machte ich eine interessante Beobachtung, die bisher noch für kein anderes Kathepsin publiziert wurde: Der Zusatz der für Kathepsin F spezifischen fluorogenen Peptidsubstrate begünstigt die Ausbildung der

Tertiärstruktur, erkennbar am Anstieg der enzymatischen Aktivität in Gegenwart der Substrate. Eine nahe liegende Erklärung wäre, dass bei der Renaturierung des Prokathepsin F ein Intermediat mit einer Molten-Globule-Struktur entsteht, das noch nicht katalytisch aktiv ist. Erst durch die Anwesenheit von Substraten bei physiologischem pH erlangt das Molekül seine finale, katalytisch aktive Konformation. In der Literatur sind Substrate schon als Faltungshilfen beschrieben worden, beispielsweise für Lysozym (Tomizawa *et al.* 1994). Dass die Versuche zur Renaturierung unter Verwendung der Substrate nicht im präparativen Maßstab weitergeführt wurden, hatte vor allem einen ökonomischen Grund: Man hätte viel teures Substrat verbraucht, lediglich im analytischen Maßstab wurde der zweite Renaturierungsschritt (d.h. die Renaturierung nach Substratzugabe) genutzt.

Prozessierung des verkürzten Prokathepsin F

Um Material für die geplanten Inhibitionsstudien zu gewinnen, versuchte ich, das mit geringer Ausbeute renaturierte Prokathepsin F autokatalytisch oder durch Pepsinbehandlung in die reife Form zu überführen. Die meisten Cysteinproteasen zeigen eine Autoaktivierung durch Inkubation bei pH-Werten zwischen 4.0 und 4.5 (Brömme *et al.* 2004). Für das humane Kathepsin F lagen uns widersprüchliche Angaben vor. Wang *et al.* gelang nach Expression einer N-terminal um 180 Aminosäuren verkürzten Version des Kathepsin F in *P. pastoris* eine erfolgreiche Autoaktivierung bei 37°C und pH 4.2 nach 48 h Inkubationszeit. Die Aussagekraft ihrer Daten ist jedoch eingeschränkt, da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Prozessierung durch Proteasen des Hefekulturüberstandes katalysiert wurde. Eine partielle Proteolyse des Präkursors ohne enzymatische Aktivierung beobachteten Fonovič *et al.* bei pH-Werten von 4.5 bis 5.0. Sie arbeiteten mit Baculovirus infizierten Sf9-Insektenzellen. Sehr wahrscheinlich wurde die Molekulargewichtsverminderung durch die V-Cath-Protease des Virus katalysiert, wie es bereits für das Prokathepsin C gezeigt werden konnte (Dahl *et al.* 2001). Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse führte ich mehrere Versuchsreihen zur Autoprozessierung des Prokathepsin F mit Variation von pH, Temperatur und Inkubationszeit durch, ohne dass eine Verkürzung des Proteins oder eine Änderung der Aktivität beobachtet werden konnte. Eine Selbstzerstörung des Enzyms ist aufgrund der gleichbleibenden Bandenintensität in den elektrophoretischen Kontrollen auszuschließen; auch mit MALDI-ToF fand ich immer nur das unveränderte Zymogen. Eine hochwahrscheinliche Ursache für das Misslingen dieser Versuche ist die geringe Konzentration an renaturiertem Prokathepsin F im Ausgangsmaterial, denn die Autoprozessierungsreaktion bei anderen Mitgliedern der Papainfamilie hat sowohl eine monomolekulare als auch eine bimolekulare Komponente, letztere ist konzentrationsab-

hängig (Kramer *et al.* 2007). Es kann aber durchaus auch sein, dass Prokathepsin F nicht zur Autoprozessierung befähigt ist. Das wäre der Fall, wenn die Zielsequenz für die limitierte Proteolyse so blockiert ist, dass es keine Katalysiemöglichkeit für das aktive Zentrum gibt, z. B. durch Substrateinlagerung. Vielleicht beschränkt sich dieses Problem auch nur auf die verkürzte Form des Prokathepsin F. Letzteres wird auch von Fonovič und Mitarbeitern für das im Baculovirus-System exprimierte Prokathepsin F diskutiert. Zwar können die meisten der bekannten Cysteinproteasen *in vitro* autoaktiviert werden, es sind aber in der Literatur auch schon Ausnahmen beschrieben worden, beispielsweise die Kathepsine X (Nägler *et al.* 1999²) und C (Dahl *et al.* 2001) oder das Kathepsin-B-ähnliche Proenzym von *Schistosoma mansoni* (Lipps *et al.* 1996). Sie alle benötigen zur Aktivierung *in vitro* eine zusätzliche Protease. *In vivo* sind bei der Kathepsinprozessierung oft Fremdproteasen beteiligt, beispielsweise Metalloproteasen zur Aktivierung der Prokathepsine B, H und L (Hara *et al.* 1988), Kathepsin D zur Aktivierung von Prokathepsin H (Nishimura and Kato 1988) und Prokathepsin B (Kawabata *et al.* 1993) sowie eine Leupeptin-sensitive Protease zur Aktivierung von Prokathepsin L (Nishimura *et al.* 1995). Dass Fremdproteasen auch für die Aktivierung des Kathepsin F *in vitro* und *in vivo* notwendig sein könnten, ist also nicht ausgeschlossen.

Die Prozessierung durch Pepsin ist eine zweite bewährte und häufig genutzte Möglichkeit zur Aktivierung von Cysteinproteasen. Vorteile sind neben der vollständigen Abtrennung der Proregion der gleichzeitige Abbau störender Fremdproteine in der Präparation (Brömme *et al.* 2004, Kramer *et al.* 2007). Dass trotz Variation aller Einflussfaktoren der Pepsinprozessierung nur sehr wenig reifes Enzym entstand (siehe Ergebnisse 7.3.2.1), ist sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass Pepsin nur das korrekt renaturierte Proenzym aktivieren kann. Der Großteil des Proenzym lag nach der Renaturierung sehr wahrscheinlich in einer Molten-globule-Konformation vor, die erst durch den Substratzusatz in die native Struktur überging. Solche Molten-globule-Strukturen werden durch Pepsin sehr schnell abgebaut (Fontana *et al.* 2004), was die beobachtete Prokathepsin-F-Zerstörung durch Pepsin erklären würde. Natürlich wurde auch versucht, vor der Pepsinprozessierung durch Substratzusatz die Renaturierungsausbeute zu erhöhen. Unter Standardbedingungen kam es dabei aber zu einem völligen Aktivitätsverlust, dessen Ursache mit der minimalen Menge an nach-renaturiertem Prokathepsin F (d.h. nach Substratzusatz renaturiertem Kathepsin F), die mir zur Verfügung stand, nicht zu ermitteln war. Dieser Versuch ist deshalb in den Ergebnissen gar nicht mit aufgeführt.

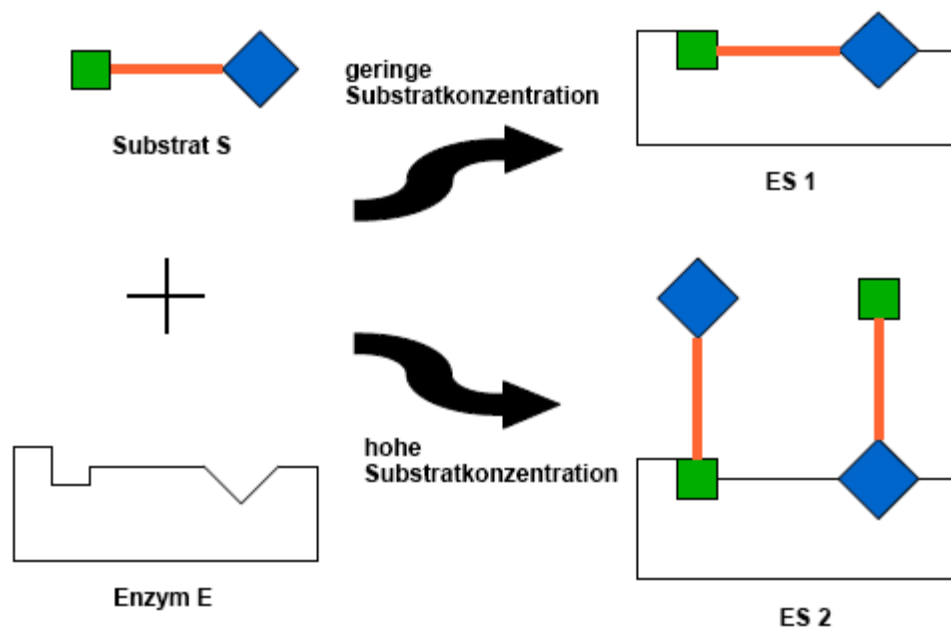
Enzymkinetische Charakterisierung des Prokathepsin F

In den Versuchsreihen zur Optimierung der Pepsinprozessierung konnte man beobachten, dass schon vor der Zugabe des Pepsins Enzymaktivitäten messbar sind. In speziellen Versuchen zur proteolytischen Aktivität des Proenzym bestätigt sich der Verdacht, dass diese so genannten „Anfangsaktivitäten“ der Aktivität des Proenzym entsprechen, die deshalb messbar werden, weil die Enzymkonzentration im Test relativ hoch gewählt worden war, um die Nachweisempfindlichkeit für das reife Enzym zu steigern. Berücksichtigt man diese Tatsache und die Beobachtung, dass Pepsin in kurzer Zeit fast das gesamte Proenzym zerstört hat (siehe Abb. 17 im Ergebnisteil 7.2.3.1), muss die geringe Steigerung der Aktivität im Verlauf der Pepsinprozessierung durch die vollständige Aktivierung eines kleinen Teils, vermutlich der korrekt renaturierten Prokathepsin-F-Moleküle verursacht worden sein, denn sonst hätte die Überlagerung mit dem Totalverlust der Proenzymaktivität nach Pepsinzusatz zu einem Abfall der im Test gemessenen Aktivität führen müssen.

Dass auch Prokathepsine katalytisch aktiv sind, ist eine beispielsweise für das Prokathepsin L (Mason *et al.* 1987, McDonald and Emerick 1995) bereits lange bekannte Tatsache. Dabei wurde für Prokathepsin L ein ähnlicher K_M -Wert, aber ein im Vergleich zum reifen Enzym um etwa eine Größenordnung niedrigerer k_{cat} -Wert gefunden (Mason *et al.* 1987). Da die Kathepsine ihre physiologische Funktion, beispielsweise in den Lysosomen, nach limitierter Proteolyse in der reifen, aktiven Form erfüllen und die Proenzymaktivität im Vergleich zum reifen Enzym äußerst gering ist, wurde eine enzymologische Charakterisierung von Proenzymen vor allem im Zusammenhang mit pathophysiologischen Vorgängen publiziert (Mason *et al.* 1987, Ishidoh *et al.* 1995). Es muss davon ausgegangen werden, dass es innerhalb der Cysteinproteasen viele proteolytisch aktive Proenzyme gibt, die diesbezüglich noch nicht systematisch charakterisiert wurden.

Beim Versuch der K_M -Wert-Bestimmung für das Prokathepsin F wurde eine deutliche Substrathemmung offensichtlich, die eine exakte Berechnung dieses Wertes verhinderte. Die Substrathemmung ist typisch für den Umsatz von synthetischen, kurzen Substraten durch Hydrolasen (Stoka *et al.* 1998, Vasiljeva *et al.* 2003) und wurde für das Kathepsin K in der eigenen Arbeitsgruppe schon systematisch untersucht (Kleint 2005). Verursacht wird diese Hemmung durch Einlagerung von mindestens zwei statt einem Substratmolekül in das aktive Zentrum des Enzyms. Das ist allerdings nur bei kurzen Peptidsubstraten möglich, und zwar dann, wenn sie in hoher Konzentration eingesetzt werden (siehe Schema 2). Bei den physiologischen Proteinsubstraten ist eine Substrathemmung aufgrund der Größe und der begrenzten molaren

Konzentration recht unwahrscheinlich. Die für die enzymkinetischen Untersuchungen verwendeten Peptidsubstrate Z-Phe-Arg-AMC und Z-Leu-Arg-AMC erfüllen durch ihre geringe Größe die Voraussetzungen für eine Substrathemmung. Sie ist folglich als Laborphänomen aufzufassen und hat *in vivo* keine Bedeutung. Durch Begrenzung der Substratkonzentration und/oder Zusatz organischer Lösungsmittel (z.B. DMSO, Azetonitril), welche die Affinität zwischen Enzym und Substrat vermindern, kann dieser störende Effekt vermeiden werden, wie es in der eigenen Arbeitsgruppe für das Kathepsin K gezeigt werden konnte (Kleint 2005).



Schema 2: Modell zum Mechanismus der Substrathemmung

Im Substrat sind zwei funktionelle Gruppen (grünes Quadrat und blaue Raute) vorhanden, die beide mit dem aktiven Zentrum des Enzyms interagieren müssen, damit es zur Produktbildung kommen kann (ES 1). Ein Komplex aus Enzym und zwei Substratmolekülen, der nicht zur Produktbildung führt, ist darunter zu sehen (ES 2).

K_M -Wert-Bestimmungen für Prokathepsin F sind bisher nicht publiziert worden, so dass ein direkter Vergleich des von mir geschätzten Wertes von etwa 20 – 50 μM mit Literaturdaten nicht möglich ist. Wie aus der folgenden Aufstellung der Ergebnisse (Tab. 9) enzymkinetischer Untersuchungen zu entnehmen ist, schwanken die K_M -Angaben für das reife Kathep-

sin F um fast zwei Größenordnungen und schließen den von mir bestimmten Wert für das Proenzym mit ein.

Tab. 9: Literaturdaten zum Vergleich der Prokathepsin-F-Charakterisierung

Literaturstelle	Fonovič <i>et al.</i> 2004	Ho <i>et al.</i> 2002	Wang <i>et al.</i> 1998
Expressionssystem	Sf9-Insektenzellen (Baculovirus)	<i>Pichia pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
Sequenzlänge (AS)	170 - 484	147- 484	183 - 484
Reinigung	mittels Kationenaustauschersäule		
Prozessierung	mit Pepsin		
K_M	17 µM	17 - 43 µM (je nach Glykolysierungsgrad)	0,44 µM
k_{cat}	1,8 s ⁻¹	1,5 - 2,9 s ⁻¹ (je nach Glykosylierungsgrad)	2,5 s ⁻¹

Der von uns nach der gleichen Methodik ermittelte k_{cat}-Wert für Prokathepsin F liegt etwa 4 Größenordnungen unter dem in der Literatur für prozessiertes Kathepsin F aus Hefe- oder Insektenzellexpressionen angegebenen Wert (siehe Ergebnisteil 7.3.3). Das liegt in der Größenordnung der Aktivitätsunterschiede zwischen anderen reifen Kathepsinen und ihren Proenzymen (Kramer *et al.* 2007). Die mittels E64 titrierbare Prokathepsin-F-Konzentration ist mit 2,225 µM vergleichsweise hoch und die Binding an den spezifischen Inhibitor könnte als Zeichen einer erfolgreichen Renaturierung interpretiert werden. Denkbar ist aber auch, dass E64, wie die Substrate Z-Phe-Arg-AMC und Z-Leu-Arg-AMC, den Übergang von einer nur partiell gefalteten Molten-globule-Konformation des Proenzyms zur nativen Konformation induziert und in meiner Präparation tatsächlich am Ende des Renaturierungsschrittes nur sehr wenig natives Proenzym vorhanden war. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass durch die Pepsin-Behandlung Prokathepsin F rasch und nahezu vollständig zerstört wurde. Das ist typisch für partiell gefaltete oder denaturierte Proteine und kann sogar als Prüfkriterium einer erfolgreichen Renaturierung genutzt werden (Fontana *et al.* 2004). Aber auch diese Interpretation ist nicht völlig sicher, denn Ho *et al.* 2002 haben gezeigt, dass auch das native Prokathepsin F durch Pepsin rasch zerstört wird.

Insgesamt ist die Datenlage zur Herstellung von Kathepsin F in der Literatur immer noch sehr widersprüchlich. Das einzig einheitliche Ergebnis, mehr als 10 Jahre nach der Entdeckung dieser Protease, ist das Scheitern aller Versuche, die vollständige Sequenz des Proenzyms rekombinant zu exprimieren. Die Expression verkürzter Varianten gelang einigen Auto-

ren (Wang *et al.* 1999, Santamaría *et al.* 1999, Somoza *et al.* 2002, Fonovič *et al.* 2004) und auch mir, aber die Ergebnisse zur nachfolgenden enzymologischen Charakterisierung sind extrem widersprüchlich. Meine Ergebnisse stimmen bezüglich der Pepsinprozessierung mit denen von Ho *et al.* 2002 (über 50 % Verluste durch Proteolyse des reifen Enzyms) und bezüglich Autoprozessierung mit denen von Fonovič *et al.* 2004 sowie Wang *et al.* 1998 (Autoprozessierung ist nicht möglich) überein. Auch die Tatsache, dass trotz zunehmender Hinweise auf interessante physiologische und pathophysiologische Funktionen des Kathepsin F (Santamaría *et al.* 1999, Wex *et al.* 1999, Lindstedt *et al.* 2003, Tang *et al.* 2005, Vazquez-Ortiz *et al.* 2005, Kaakinen *et al.* 2007) auf dem internationalen Markt zwar zahlreiche Antikörper, aber keine Enzympräparate angeboten werden, spricht für erhebliche Schwierigkeiten bei der Herstellung des Kathepsin F. Letztlich ist auch mir die Herstellung von Kathepsin F in präparativen Mengen nicht gelungen. Da das selbst produzierte Kathepsin F zur Charakterisierung des erfolgreich hergestellten Propeptides vorgesehen war, wurde selbstverständlich auch über Alternativen zur Eigenproduktion nachgedacht. Es wurde bereits erwähnt, dass das Enzym kommerziell nicht erhältlich ist. Auch bei den Arbeitsgruppen, welche die Herstellung von Kathepsin F bisher beschrieben haben, wurde nach Resten gefragt – ebenfalls ohne Erfolg.

Herstellung und teilweise Charakterisierung des verkürzten Kathepsin-F-Propeptides

Während die Enzymdomänen innerhalb der Papainfamilie trotz der relativ geringen Übereinstimmung in der Primärstruktur strukturell sehr ähnlich sind (Coulombe *et al.* 1996, LaLonde *et al.* 1999, Kaulmann *et al.* 2006), sind die Unterschiede zwischen deren Propeptiden größer (siehe Tab. 10) und ihre Strukturunterschiede bilden sogar die Grundlage für die Einordnung der Kathepsine in Unterfamilien (Karrer *et al.* 1993, Kirschke *et al.* 1995, Wex *et al.* 1999). Wie bereits in der Einleitung ausführlich erläutert, gehören Kathepsin F und W der selben Unterfamilie an, sind (bezüglich der vollständigen Sequenz) zu 54,4 % homolog (Wang *et al.* 1998) und enthalten beide das ERFNAQ-Motiv in ihren Propeptiden (siehe auch Abschnitt 4.1, Wex *et al.* 1999). Hemmversuche sowohl mit dem Mutterenzym als auch mit nahen und fernen Verwandten gehören zur üblichen Charakterisierung von inhibitorischen Propeptiden. So erhält man Aussagen zur Selektivität der Wirkung und Einblicke in Struktur-Funktions-Zusammenhänge (siehe auch Einleitung 4.1). Am Anfang solcher Untersuchungen steht die Messung der Wechselwirkung zwischen dem Propeptid und seinem Mutterenzym. Sie sind der Bezugswert zur Einordnung der Daten mit den verwandten Enzymen. Dazu kann ich aber wegen der geringen Ausbeute und der Instabilität des reifen Kathepsin F keine Aussagen treffen. Es wurde zwar eine Versuchsreihe mit Prokathepsin F unter den in der Legende zu Abb. 22

aufgeführten Bedingungen durchgeführt, aber im untersuchten Konzentrationsbereich war keine eindeutige Hemmwirkung zu sehen. Das Ergebnis ist nicht verwunderlich, denn die inhibitorischen Wirkung wird in *trans*-Experimenten untersucht, d.h. das Propeptid wird in freier Form zugesetzt, ist also nicht kovalent mit dem Enzym verbunden. Da bei meiner Präparationen zum weit überwiegenden Teil die Proregion noch im *cis*-Zustand, also kovalent mit dem Enzym verbunden war, ist durch Zusatz des Propeptides auch kaum eine Steigerung der Inhibition zu erwarten gewesen.

Demgegenüber konnte ich in *trans*-Experimenten die Wirkung des kurzen Kathepsin F-Propeptides auf die Kathepsine H, S und L testen. Auch diese Auswahl ist nicht optimal, denn es fehlt das Kathepsin W, der zweite Vertreter der Unterfamilie der Kathepsin-F-ähnlichen Cysteinproteasen und damit der nächste Verwandte des Kathepsin F. Kathepsin W stand aber deshalb nicht zur Verfügung, weil bisher weder die gentechnische Herstellung noch die Gewebeeextraktion gelang; außerdem ist bisher noch gar keine Aktivität bekannt (Bühling *et al.* 2000). Das Kathepsin-F-Propeptid hemmt von den genannten Enzymen nur das Kathepsin L mit einem K_i von ca. 100 nM (121 nM für ungereinigtes bzw. 82,5 nM für gereinigtes Propeptid, vergl. Abb. 22). Dieses Ergebnis scheint plausibel, denn von den untersuchten Enzymen ist Kathepsin L der nächste Verwandte des Kathepsin F. Das geht aus Tab. 10 hervor, in der die Ergebnisse von Vergleichen der Aminosäuresequenzen des Kathepsin F mit fünf Kathepsinen aus allen Unterfamilien der Papain – Superfamilie dargestellt sind. (Beim Vergleich zwischen den Proregionen wurde die kurze Version der Proregion des Kathepsin F zugrunde gelegt.) Die Homologie beträgt 46,5 % zwischen den Proregionen und 62,6 % zwischen den Enzymdomänen.

Um die Verwandtschaft optisch noch deutlicher hervorzuheben, wurde auch ein graphisches Alignment der Kathepsine durchgeführt. Das Ergebnis zeigt Abb. 24.

Tab. 10: Alignment der Aminosäuresequenzen mittels ClustalW2

Identität (Homologie) zum Kathepsin F in %					
	Kathepsin W	Kathepsin L	Kathepsin S	Kathepsin H	Kathepsin B
Enzymdomäne	41,1 (67,3)	43,5 (62,6)	36,4 (57)	40,2 (62,2)	25,7 (52,8)
Proregion	36,6 (55,4)	20,8 (46,5)	16,8 (40,6)	22,8 (39,6)	10,9 (26,7)

[illegible]

Abb. 24: Alignment der Aminosäuresequenzen der humanen Kathepsine F (hCTSF), W (hCTSW), L (hCTSL), S (hCTSS), H (hCTSH) und B (hCTSB)

Die Berechnung erfolgte mit Hilfe der Programme ClustalW2 und Jalview; die Sequenzen wurden der Swiss-Prot Datenbank entnommen. Dunkelblau sind die selben Aminosäuren gefärbt, hellblau ähnliche Aminosäuren (nach der Blosom62-Auswertung in Jalview). Die Nummerierung bezieht sich auf die Aminosäurepositionen des Prä-Prokathepsin F. Der vertikale Strich (zwischen den beiden Leucinen an der Stelle 169) bezeichnet den Beginn der „klassischen Proregion“, die Cystatin-ähnliche Domäne blieb beim Alignment unberücksichtigt.

Zur Inhibition Kathepsin-L-ähnlicher Endopeptidasen durch Propeptide aus der Unterfamilie der Kathepsin-W-ähnlichen Endopeptidasen gibt es bereits eine Untersuchung mit dem Propeptid vom Kathepsin W. Es ist der nächste Verwandte des von mir hergestellten Teilabschnittes des Kathepsin-F-Propeptides (Homologie 55,4 %, siehe Tab. 9). Auch dieses Propeptid hatte den stärksten Hemmeffekt auf die Aktivität des Kathepsin L und wurde von diesem nicht abgebaut. Die Abb. 25 vergleicht in einer logarithmischen Darstellung die in dieser Studie aus der eigenen Arbeitsgruppe ermittelten K_i -Werte (Kreusch 2005).

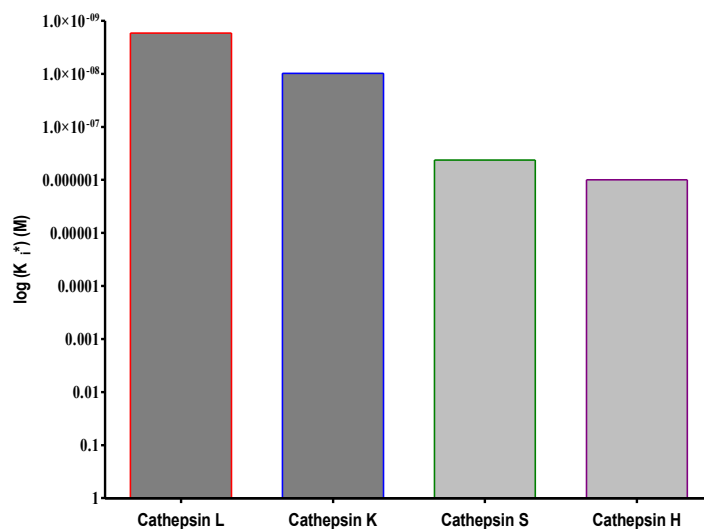


Abb. 25: K_i -Werte des Kathepsin-W-Propeptides gegenüber den Kathepsinen L, K, S und H

Die Abbildung stammt aus einem Vortrag von A. Kreusch, der im Rahmen der 22rd Winter School on "Proteinases and Their Inhibitors-Recent Developments" in Tiers/Südtirol 2005 gehalten wurde. Der K_i -Wert gegenüber Kathepsin L beträgt 32 nM. Alle Werte wurden bei einem pH von 6.5 ermittelt.

In der eigenen Arbeitsgruppe wurde weiterhin gezeigt, dass Kathepsin L auch durch die Propeptide der Kathepsine L, K, S und H gehemmt wird (Benedix 2007, Schilling *et al.* 2009). In Tabelle 11 sind die dabei gemessenen K_i -Werte zum Vergleich angegeben.

Tab. 11: Vergleich der Hemmwirkung einiger Propeptide gegenüber Kathepsin L

Propeptid vom	Ki [nM]
Kathepsin L	0.018 ± 0.005^a
Kathepsin K	0.176 ± 0.008^a
Kathepsin S	5.290 ± 0.140^a
Kathepsin H	3.59 ± 0.201^b
Kathepsin F	102 ± 27^c

^aSchilling *et al.* 2009

^bBenedix 2007

^cdiese Arbeit

Alle K_i -Werte liegen im nM-Bereich, das bedeutet, dass alle Propeptide wirksame Inhibitoren sind. Ersichtlich ist die im Vergleich mit den Propeptiden der Kathepsin-L-ähnlichen Cysteinproteasen (Kathepsine L, K, S und H) erwartungsgemäß schlechtere Hemmwirkung des Kathepsin-F-Propeptides. Betrachtet man die Aktivität des Kathpesin L gegenüber Peptidsubstraten, so muss Kathepsin L als aktivste Cysteinprotease bezeichnet werden (Kirschke *et al.* 1995). Es ist offensichtlich, dass Kathepsin L dafür ein hochflexibles aktives Zentrum besitzen muss. Dieses aktive Zentrum kann sich sowohl verschiedenen Substraten anpassen, jedoch kann es auch von strukturell verschiedenen Propeptiden wirksam gehemmt werden.

9. SCHLUSSFOLGERUNGEN

1. Prokathepsin F weist drei klar abgrenzbare Funktionsabschnitte auf: die Enzymdomäne, einen Anteil, der wie die Proregionen Kathepsin-L-ähnlicher Cysteinproteasen („klassische Proregion“) aufgebaut ist, und die Cystatin-ähnliche Domäne. Die Enzymdomäne ist schon sehr gut strukturell und enzymologisch untersucht; von den beiden anderen Domänen ist nur die Primärstruktur bekannt. Kathepsin F ist mit seiner 251 Aminosäuren langen Proregion einzigartig innerhalb der Familie der Cysteinproteasen, weil es mit der Cystatin-ähnlichen Domäne eine zur herkömmlichen Proregion zusätzliche, potentiell inhibitorische Domäne enthält.
2. Mir gelang die gentechnische Herstellung der „klassischen Proregion“ durch heterologe Expression in *E. coli*. Inhibitionsstudien zur funktionellen Charakterisierung dieser Domäne wurden begonnen. Diese sind noch unvollständig, da speziell die in diesem Zusammenhang interessantesten Zielenzyme, die Kathepsine F und W, nicht zur Verfügung standen. Der Nachweis der Hemmwirkung der „klassischen Proregion“ gegenüber Kathepsin L ist ein Beweis für die biologische Wirksamkeit meines Expressionsproduktes und lässt vermuten, dass diese Domäne auch das aktive Zentrum des Prokathepsin F blockiert.
3. Die geplanten Untersuchungen zur Funktion der Cystatin-ähnlichen Domäne ließen sich nicht realisieren, da die entsprechenden DNA-Konstrukte in *E. coli* nicht exprimiert wurden. Ein Codon-Usage-Problem, das sich aus der Basensequenz dieser Domäne vorhersagen lässt, konnte durch Probeexpressionen im *E. coli*-Rosetta-Stamm als alleinige Ursache ausgeschlossen werden. Der Grund für das Misslingen der Versuche von insgesamt 4 Arbeitsgruppen zur heterologen Expression der vollständigen Prokathepsin-F-Sequenz in ganz unterschiedlichen Expressionssystemen bleibt damit weiter unklar.
4. Das um die Cystatin-ähnliche Domäne verkürzte Prokathepsin F ließ sich zwar in *E. coli* exprimieren und präzipitierte in Einschlusskörperchen, aber die Renaturierung *in vitro* brachte nur eine minimale Ausbeute an korrekt gefaltetem Proenzym. Da insbesondere dieses Problem mit erheblichem experimentellen Aufwand unter Berücksichtigung eigener und fremder Erfahrungen im Umgang mit schwer renaturierbaren Proteinen angegangen wurde, kann man vermuten, dass die Ursache gemäß Anfansens

Theorie im Fehlen der Cystatin-ähnlichen Domäne zu suchen ist. Das wäre zumindest ein erster Hinweis auf eine mögliche Funktion dieses Molekülabschnittes bei der Biosynthese des Prokathepsin F.

5. Zwei Befunde sprechen dafür, dass das Prokathepsin F unter den optimierten Renaturierungsbedingungen eine Molten–Globule-Struktur annimmt: (i) Pepsin zerstört nicht nur die Proregion, wie bei allen anderen bisher untersuchten Kathepsinen (heterokatalytische Prozessierung), sondern auch die Enzymdomäne und (ii) der Zusatz der unter Punkt 6 näher bezeichneten Peptidsubstrate führt zu einer langsamen Steigerung der katalytischen Wirksamkeit. Die letztgenannte Beobachtung wurde zwar schon bei anderen Enzymen beschrieben, für Kathepsine ist sie jedoch neu. Zusatz preiswerter Di- oder Tripeptide zum Renaturierungsmedium könnte also unter gewissen Bedingungen zur Optimierung der bakteriellen Herstellungsverfahren von Proteasen dienen.
6. Das um die Cystatin-ähnliche Domäne verkürzte Prokathepsin F zeigt eine geringe enzymatische Wirksamkeit gegenüber den Peptidsubstraten, die für das reife Kathepsin F als optimal identifiziert wurden. Das ist nicht verwunderlich, da ähnliche Beobachtungen auch für andere Kathepsine publiziert wurden. Diese minimale Aktivität reicht aber offensichtlich nicht aus, um eine autokatalytische Aktivierung des Zymogens zu initiieren.
7. Die biologische Wirksamkeit und die Bedeutung von Kathepsin F für Säugerorganismen könnte neben den bereits durchgeführten knock-out-Maus-Versuchen mit Hilfe von antisense-RNA überprüft werden.

10. LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

Abrahamson M, Ritonja A, Brown MA, Grubb A, Machleidt W and Barrett AJ (1987) Identification of the Probable Inhibitory Reactive Sites of the Cysteine Proteinase Inhibitors Human Cystatin C and Chicken Cystatin. *The Journal of Biological Chemistry* **262**:9688-9694

Anastasi A, Brown MA, Kembhavi AA, Nicklin MJ, Sayers CA, Sunter DC, and Barrett AJ (1983) Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteinases. Improved purification from egg white, characterization, and detection in chicken serum. *The Biochemical Journal* **211**:129-138

Anfinsen CB (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**:223-230

Atley LM, Mort JS, Lalumiere M and Eyre DR (2000) Proteolysis of human bone collagen by cathepsin K: characterization of the cleavage sites generating by cross-linked N-telopeptide neoepitope. *Bone* **26**:241-247

Beckmann M (2006) Untersuchungen zur Foldasefunktion der Proegionen der Cathepsine B und X [Dissertation] Jena: Friedrich-Schiller-Universität

Benedix Y (2007) Untersuchung zur Selektivität der Hemmung von Cathepsin L-ähnlichen Cysteinproteasen durch die dazugehörigen Propeptide [Dissertation] Jena: Friedrich-Schiller-Universität

Berti PJ and Storer AC (1995) Alignment/Phylogeny of the Papain Superfamily of Cysteine Proteases. *Journal of Molecular Biology* **246**:273-283

Billington CJ, Mason P, Magny MC and Mort JS (2000) The Slow-Binding Inhibition of Cathepsin K by Its Propeptide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **276**:924-929

Björck L, Akesson P, Bohus M, Trojnar J, Abrahamson M, Olafsson I and Grubb A (1989) *Bacterial growth blocked by a synthetic peptide based on the structure of a human proteinase inhibitor.* *Nature* **337**:385-386

Bobek LA and Levine MJ (1992) Cystatins-Inhibitors of Cysteine Proteinases. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* **3**:307-332

Brinkworth RI, Tort JF, Brindley PJ and Dalton JP (2000) Phylogenetic relationships and theoretical model of human cathepsin W (lymphopain), a cysteine proteinase from cytotoxic T lymphocytes. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **32**:373-384

Brocklehurst K, Willenbrock F and Salih E (1987) Cysteine proteinases. In: Neuberger A and Brocklehurst K (Hrsg.) *Hydrolytic Enzymes*. Amsterdam: *Elsevier Biomedical Press*, 39-158

Brocklehurst K, Kowlessur D, Patel G, Templeton W, Quigley K, Thomas EW, Wharton CW, Willenbrock F and Szawelski RJ (1988) Consequences of molecular recognition in the S1-S2 intersubsite region of papain for catalytic-site chemistry. Change in pH-dependence characteristics and generation of an inverse solvent kinetic isotope effect by introduction of a P1-P2 amide bond into a two-protonic-state reactivity probe. *The Biochemical Journal* **250**:761-772

Brömme D and Okamoto K (1995) *Human cathepsin O2, a novel cysteine protease highly expressed in osteoclastomas and ovary molecular cloning, sequencing and tissue distribution.* *Biological Chemistry Hoppe Seyler* **376**:379-384.

Brömme D, Bonneau PR, Purisima E, Lachance P, Hajnik S, Thomas DY and Storer A (1996) Contribution to Activity of Histidine-Aromatic, Amide-Aromatic, and Aromatic-Aromatic Interactions in the Extended Catalytic Site of Cysteine Proteinases. *Biochemistry* **376**:3970-3979

Brömme D, Nallaseth FS and Turk B (2004) Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases. *Methods* **32**:199-206

Bühling F, Fengler A, Brandt W, Welte T, Ansorge S and Nögler D (2000) Review: Novel Cysteine Proteases of the Papain Family. In: Langner and Ansorge (Hrsg.) Cellular Peptidases in Immune Functions and Diseases 2. *Kluwer Academic Plenum Publishers*

Carmona E, Dufour E, Plouffe C, Takebe S, Mason P, Mort JS and Ménard R (1996) Potency and selectivity of the cathepsin L propeptide as an inhibitor of cysteine proteases. *Biochemistry* **35**:8149-8157

Chen Y, Plouffe C, Ménard R and Storer A (1996) Delineating functionally important regions and residues in the cathepsin b propeptide for inhibitory activity. *FEBS Letters* **393**:24-26

Cigić B, Dahl S and Pain R (2000) The Residual Pro-Part of Cathepsin C Fulfills the Criteria Required for an Intramolecular Chaperone in Folding and Stabilizing the Human Proenzyme. *Biochemistry* **39**:12383-12390

Cleland WW (1979) Substrate Inhibition. *Methods in Enzymology* **63**:500-513

Coulombe R, Grochulski P, Sivaraman J, Ménard R, Mort JS and Cygler M (1996) Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. *The EMBO Journal* **15**:5492-5503

Cygler M and Mort JS (1997) Proregion structure of the papain superfamily. Mode of inhibition of enzymatic activity. *Biochimie* **79**:645-652

Dahl SW, Halkier T, Lauritzen C, Dolenc I, Pedersen J, Turk V and Turk B (2001) Human recombinant pro-dipeptidyl peptidase I (cathepsin C) can be activated by cathepsins L and S but not by autocatalytic processing. *Biochemistry* **40**:1671-1678

Deussing J, Tisljar K, Papazoglou A and Peters C (2000) Mouse cathepsin F: cDNA cloning, genomic organization and chromosomal assignment of the gene. *Gene* **251**:165-173

Dong H, Nilsson L and Kurland, CG (1996) Co-variation of tRNA abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rates. *Journal of Molecular Biology* **260**:649-663

Drake F, Dodds R, James I, Connor J, Debuck C, Richardson S, Lee-Rykaczewski E, Coleman L, Rieman D, Barthlow R, Hastings G and Gowen M (1996) Cathepsin K, but Not Cathepsins B, L, or S, Is Abundantly Expressed in Human Osteoclasts. *The Journal of Biological Chemistry* **271**:12511-12516

Fontana A, de Laureto PP, Spolaore B, Frare E, Picotti P and Zamboni M (2004) Probing protein structure by limited proteolysis. *Acta Biochimica Polonica* **51**:299-321

Fonovič M, Brömme D, Turk V and Turk B (2004) Human Cathepsin F: expression in baculovirus system, characterization and inhibition by protein inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry* **385**:505-509

Fox T, de Miguel E, Mort JS and Storer AC (1992) Potent slow-binding inhibition of cathepsin B by its propeptide. *Biochemistry* **31**:12571-12576

Gelb BD, Shi GP, Chapman HA and Desnick RJ (1996) Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science* **273**:1236-1238

Guay J, Falgout JP, Ducret A, Percival MD and Mancini JA (2000) Potency and selectivity of inhibition of cathepsin K, L and S by their respective propeptides. *European Journal of Biochemistry* **267**:6311-6318

Hara K, Kominami E and Katunuma N (1988) Effect of proteinase inhibitors on intracellular processing of cathepsin B, H and L in rat macrophages. *FEBS Letters* **231**:229-231

Ho J, Meltzer Y, Buggy J, Palmer J, Elrod K, Chan H, Mortara K and Somoza J (2002) Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of human cathepsin F complexed with an irreversible vinyl sulfone inhibitor. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **58**:2187-2190

Hou WS, Brömme D, Zhao Y, Mehler E, Dushey C, Weinstein H, Miranda CS, Fraga C, Creig F, Carey J, Rimoin DL, Desnick RJ and Gelb, BD (1999) Characterization of novel cathepsin K mutations in the pro and mature polypeptide regions causing pycnodysostosis. *The Journal of Clinical Investigation* **103**:731-738

Ishidoh K, Kominami E (1995) Procathepsin L degrades extracellular matrix proteins in the presence of glycosaminoglycans *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **217**:624-631

Ikemura T (1981) Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: A proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the *E. coli* translational system. *Journal of Molecular Biology* **151**:389-409

Johnson MR, Polymeropoulos MH, Vos HL, Ortiz de Luna RI and Francomano CA (2007) A nonsense mutation in the cathepsin K gene observed in a family with pycnodysostosis. *Genome Research* **6**:1050-1055

Kaakinen R, Lindstedt KA, Sneek M, Kovanen PT and Öörni K (2007) Angiotensin II increases expression and secretion of cathepsin F in cultured human monocyte-derived macrophages: An angiotensin II type 2 receptor-mediated effect. *Atherosclerosis* **192**:323-327

Kaulmann G, Palm GJ, Schilling K, Hilgenfeld R and Wiederanders B (2006) The crystal structure of a Cys25→Ala mutant of human procathepsin S elucidates enzyme-prosequence interactions. *Protein Science* **15**:2619-2629

Karrer KM, Peiffer SL and DiTomas ME (1993) Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**:3063-3067

Kawabata T, Nishimura Y, Higaki M and Kato K (1993) Purification and Processing of Rat Liver Procathepsin B. *Journal of Biochemistry* **113**:389-394

Keilová, H and Tomášek V (1974) Effect of Papain Inhibitor from Chicken egg White on Cathepsin B₁. *Biochimica et biophysica acta* **334**:179-186

Kirschke H, Barrett AJ and Rawlings ND (1995) Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. *Protein Profile* **2**:1581-1643

Kleint R (2005) Analyse von Cathepsin K- Ligand- Wechselwirkungen: Vorarbeiten zur Untersuchung der Propeptid- katalysierten Faltung dieses Enzyms [Dissertation] Jena: Friedrich-Schiller-Universität

Kopitar G, Dolinar M, Štrukelj B, Pungerčar J and Turk V (1996) Folding and activation of human procathepsin S from inclusion bodies produced in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry* **236**:558-562

Körner A (2007) Untersuchungen zur Spezifität der Foldasewirkung in der Papain-Familie [Dissertation] Jena: Friedrich-Schiller-Universität

Kramer G (2007) Optimierung der Herstellung von rekombinantem humanem Cathepsin S [Dissertation] Jena: Friedrich-Schiller-Universität

Kramer G, Paul A, Kreusch A, Schüler S, Wiederanders B and Schilling K (2007) Optimized folding and activation of recombinant procathepsin L and S produced in *E. coli*. *Protein Expression and Purification* **54**:147-156

Kreusch A (2005) Cathepsin W propeptide: a rigid inhibitor of cysteine proteases [Vortrag]
In: 22rd Winter School on Proteinases and Their Inhibitors- Recent Developments.
Tiers/Südtirol

Kreusch S, Fehn M, Maubach G, Nissler K, Rommerskirch W, Schilling K, Weber E, Wenz I and Wiederanders, B (2000) An evolutionarily conserved tripartite tryptophan motif stabilizes the prodomains of cathepsin L-like cysteine proteases. *European Journal of Biochemistry* **267**:2965-2972

Kuhelj R, Dolinar M, Pungerčar J and Turk V (1995) The preparation of catalytically active human cathepsin B from its precursor expressed in *Escherichia coli* in the form of inclusion bodies. *European Journal of Biochemistry* **229**:533-539

LaLonde JM, Zhao B, Janson CA, D'Alessio KJ, McQueney MS, Orsini MJ, Debouck CM and Smith WW (1999) The Crystal Structure of Human Procathepsin K. *Biochemistry* **38**:862-869

Lämmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685

Li Y, Zhixiang H, Jordan F and Inouye M (1995) Functional Analysis of the Propeptide of Subtilisin E as an Intramolecular Chaperone for Protein Folding. *The Journal of Biological Chemistry* **270**:25127-25132

Lindstedt L, Lee M, Öörni K, Brömme D and Kovanen P (2003) Cathepsin F and S block HDL₃-induced cholesterol efflux from macrophage foam cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **312**:1019-1024

Mason RW, Gal S and Gottesman MM (1987) The identification of the major excreted protein (MEP) from a transformed mouse fibroblast cell line as a catalytically active precursor form of cathepsin L. *The Biochemical Journal* **248**:449-454

Mason RW, Sol-Church K and Abrahamson M (1998) Amino acid substitutions in the N-terminal segment of cystatin C create selective protein inhibitors of lysosomal cysteine proteinases. *The Biochemical Journal* **330**:833-838

Maubach G, Schilling K, Rommerskirch W, Wenz I, Schultz JE, Weber E and Wiederanders B (1997) The inhibition of cathepsin S by its propeptide--specificity and mechanism of action. *European Journal of Biochemistry* **250**:745-750

McDonald and Emerick JM (1995) Purification and characterization of procathepsin L, a self-processing zymogen of guinea pig spermatozoa that acts on a cathepsin D assay substrate. *Archives of biochemistry and biophysics* **323**:409-422

McIntyre GF and Erickson AH (1993) The lysosomal proenzymes receptor that binds procathepsin L microsomal membranes at pH 5 is a 43-kDa integral membrane protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**:10588-10592

Mohamed MM and Sloane BF (2006) Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nature reviews. Cancer* **6**:764-775

Morozova LA, Haynie DT, Arico-Muendel C, van Dael H and Dobson CM (1995) Structural basis of the stability of a lysozyme molten globule. *Nature Structural Biology* **2**:871-875

Nakagawa T, Roth W, Wong P, Nelson A, Farr A, Deussing J, Villadangos J, Ploegh H, Peters C and Rudensky A (1998) Cathepsin L: Critical Role in Ii Degradation and CD4 T Cell Selection in the Thymus. *Science* **280**:450

Näglér DK, Sulea T and Ménard R (1999) Full-Length cDNA of Human Cathepsin F Predicts the Presence of a Cystatin Domain at the N-terminus of the Cysteine Protease Zymogen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **257**:313-318¹

Nägler DK, Zhang R, Tam W, Sulea T, Purisimia EO and Ménard R (1999) Human cathepsin X: A cysteine protease with unique carboxypeptidase activity. *Biochemistry* **38**: 12648-12654²

Nishimura Y and Kato K (1987) Intracellular transport and processing of lysosomal cathepsin H. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **148**:329-334¹

Nishimura Y and Kato K (1987) Intracellular transport and processing of lysosomal cathepsin B. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **148**:254-259²

Nishimura Y and Kato K (1988) Identification of latent procathepsin H in microsomal lumen: characterization of proteolytic processing and enzyme activation. *Archives of biochemistry and biophysics* **260**:712-718

Nishimura Y, Kato K, Furuno K and Himeno M (1995) Inhibitory effect of leupeptin on the intracellular maturation of lysosomal cathepsin L in primary cultures of rat hepatocytes. *Biological & pharmaceutical bulletin* **18**:945-950

Nissler K, Kreusch S, Rommerskirch W, Strubel W, Weber E and Wiederanders B (1998) Sorting of non-glycosylated human procathepsin S in mammalian cells. *Biological Chemistry* **379**:219-224.

Öörni K, Sneek M, Brömme D, Pentikäinen MO, Lindstedt KA, Mäyränpää M, Aitio H and Kovanen PT (2004) Cystatin Protease Cathepsin F Is Expressed in Human Atherosclerotic Lesions, Is Secreted by Cultured Macrophages, and Modifies Low Density Lipoprotein Particles *in Vitro*. *European Journal of Biochemistry* **279**:34776-34784

Park H, Hong K-M, Sakanari J, Choi J-H, Park S-K, Kim K-Y, Hwang H-A, Paik M-K, Yun K-J, Shin C-H, Lee J-B, Ryu J-S and Min D-Y (2001) *Paragonimus westermani*: Cloning of a Cathepsin F-like Cysteine Proteinase from the Adult Worm. *Experimental Parasitology* **98**:223-227

Paul A (2006) Optimierung der präparativen Herstellung von rekombinantem humanem Cathepsin L [Dissertation] Jena: Friedrich-Schiller-Universität

Pietschmann S (2002) Die Foldasefunktion des Propeptids des humanen Cathepsin S [Dissertation] Jena: Friedrich-Schiller-Universität

Pietschmann S, Fehn M, Kaulmann G, Wenz I, Wiederanders B and Schilling K (2002) Foldase function of the cathepsin S proregion is strictly based upon its domain structure. *Biological Chemistry* **383**:1453-1458

Rasch D, Verdooren LR, Gowers JI (1999) Grundlagen der Planung und Auswertung von Versuchen und Erhebungen. München Wien: *Oldenburg Verlag*

Redmond DL, Smith SK, Halliday S, Smith WD, Jackson F, Knox DP and Matthews JB (2006) An immunogenic cathepsin F secreted by the parasitic stages of *Teladorsagia circumcincta*. *International Journal for Parasitology* **36**:277-286

Reis FCG, Costa TFR, Sulea T, Mezzetti A, Scharfstein J, Brömme D, Ménard R and Lima APCA (2006) The propeptide of cruzipain- a potent selective inhibitor of the trypanosomal enzymes cruzipain and brucipain, and of the enzyme cathepsin F. *FEBS Journal* **274**:1224-1234

Riese R, Wolf P, Brömme D, Natkin L, Villadangos J, Ploegh H and Chapman H (1996) Essential Role for Cathepsin S in MHC Class II-Associated Invariant Chain Processing and Peptide Loading. *Immunity* **4**:357-366

Rudolph R, Böhm G, Lilie H, Jaenicke R (1997) Folding Proteins. In: Creighton TE, Hrsg. Protein Function, a practical approach. Zweite Auflage. New York: *Oxford University Press*

Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*

Santamaría I, Velasco G, Pendás AM, Paz A and López-Otín C (1999) Molecular Cloning and Structural and Functional Characterization of Human Cathepsin F, a New Cysteine Proteinase of the Papain family with a Long Propeptide Domain. *The Journal of Biological Chemistry* **274**:13800-13809

Schilling K, Körner A, Schmisch S, Kreusch A, Kleint R, Benedix Y, Schlabrakowski A and Wiederanders B (2009) Selectivity of Propeptide-Enzyme Interaction [running title]. *Biological Chemistry* 2009 [In Press]

Shi GP, Villandangos JA, Dranoff G, Small C, Gu L, Haley KJ, Riese R, Ploegh HL, Chapman HA (1999) Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* **10**:197-206

Shi G, Bryant R, Riese R, Verhelst S, Driessen C, Li Z, Brömme D, Ploegh H and Chapman H (2000) Role for Cathepsin F in Invariant Chain Processing and Major Histocompatibility Complex Class II Peptide Loading by Macrophages. *Journal of Experimental Medical Sciences* **191**:1177-1186

Sijwali PS, Shenai BR and Rosenthal PJ (2002) Folding of the *Plasmodium falciparum* Cysteine Protease Falcipain-2 Is Mediated by a Chaperone-like Peptide and Not the Prodomain. *The Journal of Biological Chemistry* **277**:14910-14915

Sohl JL, Jaswal SS and Agard DA (1998) Unfolded conformations of alpha-lytic protease are more stable than its native state. *Nature* **395**:817-819

Somoza J, Palmer J and Ho J (2002) The Crystal Structure of Human Cathepsin F and Its Implications for the Development of Novel Immunomodulators. *Journal of molecular biology* **322**:559-568

Stenman G, Aström AK, Röijer E, Sotiropoulou G, Zhang M and Sager R (1997) Assignment of a novel cysteine proteinase inhibitor (CST6) to 11q13 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenetics and Cell Genetics* **76**:45-46

Stoka V, McKerrow JH, Cazzulu JJ and Turk V (1998) Substrate inhibition of cruzipain is not affected by the C-terminal domain. *FEBS Letters* **429**:129-133

Takeuchi KH and Swank RT (1989) Inhibitors of elastase and cathepsin G in Chédiak-Higashi (beige) neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry* **264**:7431-7436

Tang CH, Lee JW, Galvez MG, Robillard L, Mole SE and Chapman HA (2006) Murine Cathepsin F Deficiency Causes Neuronal Lipofuscinosis and Late-Onset Neurological Disease. *Molecular and Cellular Biology* **26**:2309-2316

Tao K, Stearns NA, Dong J, Wu QL and Sahagain GG (1994) The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit. *Archives of biochemistry and biophysics* **311**:19-27

Tobbell DA, Middleton BJ, Raines S, Needham MRC, Taylor IW, Beveridge JY and Abbott WM (2002) Identification of *in Vitro* Folding Conditions for Procathepsin S and Cathepsin S Using Fractional Factorial Screens. *Protein Expression and Purification* **24**:242-254

Tomizawa H, Yamada H, Ueda T and Imoto T (1994) Isolation and characterization of 101-succinimide lysozyme that possesses the cyclic imide at Asp101-Gly102. *Biochemistry* **33**:8770-8774

Tsumoto K, Ejima D, Kumagai I and Arakawa T (2003) Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expression and Purification* **28**:1-8

Turk V and Bode W (1991) The cystatins: Protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Letters* **285**:213-219

Turk B, Turk V and Turk D (1997) Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biological Chemistry* **378**:141-150

Turk V, Turk B and Turk D (2001) Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *The EMBO Journal* **20**:4629–4633

Vasiljeva O, Dolinar M, Turk, V and Turk B (2003) Recombinant Human Cathepsin H Lacking the Mini Chain Is an Endopeptidase. *Biochemistry* **42**:13522-13528

Vazquez-Ortiz G, Pina-Sanchez P, Vazquez K, Duenas A, Taja L, Mendoza P, A Garcia J and Salcedo M (2005) Overexpression of cathepsin f, matrix metalloproteinases 11 and 12 in cervical cancer. *BMC Cancer* **5**:68

Villadangos JA, Riese R, Peters C, Chapman H and Ploegh H (1997) Degradation of Mouse Invariant Chain: Roles of Cathepsins S and D. *The Journal of Experimental Medicine* **186**:549-560

Villadangos JA, Bryant RA, Deussing J, Driessen C, Lennon-Duménil AM, Riese RJ, Roth W, Saftig P, Shi GP, Chapman HA, Peters C and Ploegh HL (1999) Proteases involved in MHC class II antigen presentation. *Immunological Reviews* **172**:109-20

Wang B, Shi G, Yao PM, Li Z, Chapman HA and Brömme D (1998) Molecular Cloning, Functional Expression, Tissue Localisation and Enzymatic Characterization. *The Journal of Biological Chemistry* **273**:32000-32008

Wex T, Levy B, Wex H and Brömme D (1999) Human Cathepsin F and W: A New Subgroup of Cathepsins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **259**:401-407

Wex T, Bühling F, Wex H, Günther D, Malfertheiner P, Weber E and Brömme D (2001) Human cathepsin W, a cysteine protease predominantly expressed in NK cells, is mainly localized in the endoplasmic reticulum. *Journal of Immunology* **167**:2172-2178

Wiederanders B (2000) The function of propeptide domains of cysteine proteinases. *Advances in experimental medicine and biology* **477**:261-270

Wiederanders B (2003) Functions of Propeptide Parts in Cysteine Proteases. *Current Protein and Peptide Science* **4**:309-326

Yamamoto Y, Watabe S, Kageyama T and Takahashi SY (1999) Proregion of *Bombyx mori* cysteine proteinase functions as an intramolecular chaperone to promote proper folding of the mature enzyme. *Archives of insect biochemistry and physiology* **42**:167-178

Zhu XL, Ohta Y, Jordan F and Inouye M (1989) Pro-sequence of subtilisin can guide the refolding of denatured subtilisin in an intermolecular process. *Nature* **339**:483-484

DANKSAGUNG

Abschließend möchte ich allen danken, die mich direkt oder indirekt unterstützt und somit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Wiederanders gilt mein Dank für die freundliche Aufnahme am Institut, die Überlassung des interessanten Themas und das in mich gesetzte Vertrauen. Er stand für die Diskussion inhaltlicher Probleme stets zur Verfügung und gab kritische und produktive Hinweise sowohl auf experimentellem Gebiet als auch bei der Anfertigung der schriftlichen Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Schilling, der mir mit seiner ausgezeichneten Betreuung stets zur Seite stand, wertvolle Ratschläge gab, viel Geduld und aufmunternde Worte zeigte und für ein freundliche und produktive Arbeitsatmosphäre sorgte. Auch danke ich ihm für seine Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Experimente und der Anfertigung der schriftlichen Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie danke ich für die gute Zusammenarbeit, die fortwährende Hilfsbereitschaft, die zahlreichen wissenschaftlichen Anregungen und die entspannte Arbeitsatmosphäre.

Annett Kreusch danke ich für die fortwährende kompetente Beratung, die Anleitung und Unterstützung bei der Durchführung der praktischen molekularbiologischen Arbeiten und ihre hilfreiche Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Besonderer Dank gebührt auch Frau Dr. Susann Schüler für ihre wissenschaftliche Hilfe und Unterstützung bei den zahlreichen Expressionsversuchen.

Frau Erdmann und Frau Tautkus danke ich für die Durchführung der MALDI-Untersuchungen; Frau Seul und Frau Schade gilt mein Dank für die Unterstützungen bei verschiedensten Experimenten.

PD Dr. Dorit K. Nögler gilt mein Dank für die Bereitstellung der Kathepsin-F-DNA.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des IMB, insbesondere bei Herrn Dr. Schlott, für die qualitativ sehr guten N-terminalen Sequenzierungen und die komplikationslose Zusammenarbeit.

Ich möchte mich auch bei allen Doktoranden der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. K. Schilling bedanken, deren Hilfsbereitschaft mir vor allem zu Beginn das Experimentieren sehr erleichterte.

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Diana Müller, geboren 1984 in Mühlhausen, dass mir die Promotionsordnung der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind, mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. B. Wiederanders, Dr. K. Schilling, Annett Kreusch und Dr. Susann Schüler, die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit Inhalten der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name: Müller
Vorname: Diana
Anschrift: Kronfeldstraße 14
07745 Jena
Geburtsdatum: 07.02.1984
Geburtsort: Mühlhausen
Familienstand: ledig

Schulbildung:

09/1990 – 07/1994: Grundschule in Heyerode
08/1994 – 06/2002: Staatliches Gymnasium Oberdorla mit Ablegen des Abiturs

Hochschulbildung:

seit 09/2002: Medizinstudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
09/2004: Ablegen der Ärztlichen Vorprüfung (1. Staatsexamen)
09/2007-02/2008: Medizinstudium an der Universitat Autònoma de Barcelona
seit 06/2005: Promotion zum Thema „Inhibition von Papain-ähnlichen Cystein-proteasen durch Propeptidkonstrukte des Kathepsin F“ am Institut für Biochemie I der FSU Jena